

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Vývojová biologie



Bc. Lucie Smrčková

Časný vývoj dentice u myší kmene Tabby

Early tooth development of Tabby mice

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: MUDr. Renata Peterková, CSc.

Praha, 2012

Podklady pro tuto práci vznikaly v letech 2009 – 2012 pod vedením MUDr. Renaty Peterkové, CSc s finanční podporou Grantové agentury ČR (granty č. 304/07/0223 a 304/09/1579) a Akademie věd ČR (projekt číslo AV0Z 50390512).

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 4. 5. 2012

Lucie Smrčková

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala všem, kteří mě podporovali během zpracovávání této diplomové práce.

V první řadě děkuji mé školitelce MUDr. Renatě Peterkové, CSc., za pomoc a podporu při tvorbě diplomové práce, pozitivní lidský přístup, cenné rady a odborné vedení během celého mého působení ve vědeckém světě. Děkuji také vedoucímu Oddělení Teratologie MUDr. Miroslavu Peterkovi, CSc. a všem svým kolegům za pomoc a vytvoření milé pracovní atmosféry. Konkrétně děkuji Mgr. Márii Hovořákové PhD, Mgr. Michaele Rothové PhD, Mgr. Janu Procházkovi PhD, Mgr. Svatavě Churavé a Bc. Kateřině Lochovské, bez jejichž podpory, pomoci a rad by tato práce nevznikla.

V neposlední řadě děkuji své rodině a Milanovi Horákovi za lásku a podporu ve chvílích, kdy byla třeba. Děkuji také svým přátelům, kteří mi pomohli neztratit úsměv na rtech.

Abstrakt

Vyvíjející se myší zub je výborný model pro studium molekulární regulace odontogeneze a organogeneze. Embryonální myší dentice se skládá ze základů funkčních zubů a základů zubů rudimentárních, které svůj růst v průběhu vývoje zastaví a zaniknou, nebo se stanou součástí funkčního zubu.

Myši s poruchami genů nám navíc umožňují objasňovat funkce jednotlivých genů, jejich produktů a signálních drah. Ektodysplasin je protein nezbytný pro správný vývoj ektodermových derivátů – kůže, vlasů, žláz a zubů. Myši Tabby, které mají mutaci v genu *Eda*, kódujícím protein ektodysplasin, vykazují ve své dentici řadu vývojových poruch. Časný vývoj dentice dolní čelisti Tabby embryí byl morfologicky zmapován. Předpokladem pro správné pochopení regulačních mechanismů odontogeneze u myši Tabby je však také zmapování časoprostorové dynamiky signálních center při časném vývoji zubních základů. Jedním z markerů signálních center během časně odontogeneze je *Shh* exprese.

Cílem této diplomové práce bylo porovnat signální centra zubních primordií na základě exprese *Shh* a její časoprostorové dynamiky v dolní čelisti Tabby a WT myších zárodků. Tyto výsledky byly poté korelovány se známými morfologickými daty s cílem přispět k objasnění role rudimentárních zubních základů při vývoji funkčních zubů u myši Tabby, a tím nepřímo také k objasnění role *Eda* genu v odontogenezi.

S využitím metod whole mount in situ hybridizace, zpracování vzorků do formy zmrazených řezů a tvorby 3D rekonstrukcí se nám podařilo prokázat, že v řezákové oblasti dolní čelisti Tabby zárodků se na časných stádiích objevuje exprese *Shh*, která ještě nenáleží funkčnímu řezáku, nýbrž rudimentárnímu (prelakteálnímu) zubu. Tato exprese nebyla u Tabby ovlivněna. Oproti tomu exprese na pozdějších stádiích, která patří funkčnímu řezáku, byla oproti WT zárodkům výrazně snížena. Na rozdíl od funkčního řezáku tedy *Eda* gen nejspíš není pro vývoj rudimentů v řezákové oblasti klíčový. Avšak zdá se, že v tvářové oblasti vývoj premolárových rudimentů výrazně ovlivňuje. Ačkoli nebyl v dolní čelisti Tabby myši morfologicky detekován pupen R2 v místě, kde je lokalizován u WT zárodků, našli jsme v tomto místě u Tabby zárodků *Shh* expresi. Ta ale byla oproti WT zárodkům opožděna. Je tedy pravděpodobné, že se R2 u Tabby vyvíjí, avšak mutace *Eda* genu způsobuje jeho opoždění, hypoplazii a malformaci, což má za následek vznik morfotypů Tabby dentice.

Klíčová slova: zub, myš, Tabby, *Eda*, *Shh*, rudimentární zub, časný vývoj zubu

Abstract

The developing mouse dentition is a very useful tool to study molecular regulation of odontogenesis and also organogenesis. The embryonic mouse dentition comprises developing functional tooth primordia as well as rudimentary tooth primordia. These rudiments arrest their growth during development and either degenerate or become a part of a functional tooth.

Mice with gene defects also allow elucidation of a function of genes, their products and signalling pathways. The protein ectodysplasin is essential for development of ectodermal derivatives - skin, hair, glands and teeth. The Tabby mice have a mutation in the *Eda* gene, which encodes the protein ectodysplasin, and they display a number of dentition anomalies. Early development of the lower jaw dentition in Tabby embryos has been already morphologically described. As a prerequisite for understanding regulatory mechanisms of odontogenesis in Tabby mice, it is also necessary to map the spatiotemporal dynamics of signalling centres that express *Shh* in both the rudimentary and functional tooth primordia.

The aim of this thesis was to compare the signalling centres based on the *Shh* expression and its spatiotemporal dynamics in the lower jaw of Tabby and WT mouse embryos. Then the *Shh* data were correlated with known morphological data to clarify the role of rudimentary tooth primordia in development of functional teeth in Tabby mice, and thus also to contribute to elucidation of the role of the *Eda* gene in odontogenesis.

Using the methods of whole mount in situ hybridization, frozen sections and 3D reconstruction we found, that the *Shh* expression in the mandibular incisor area of Tabby embryos at early developmental stages does not yet belong to the functional incisor, but to the rudimentary (prelacteal) tooth primordium. This early expression was not affected in Tabby embryos. In contrast, the *Shh* expression at later stages, belonging to the functional incisor, was markedly reduced compared to the WT embryos. Contrary to the functional incisor, *Eda* gene is probably not essential for the development of the rudimentary incisor. However, it seems that *Eda* influences development of R2 premolar rudiment in the cheek region. Although the R2 bud was not morphologically detected in Tabby mouse mandible, we found the *Shh* expression there corresponding to the R2 place in WT embryos. However this expression in Tabby was delayed compared to WT embryos. It is therefore probable that R2 forms in Tabby, but the gene mutation causes its developmental delay, hypoplasia and malformation which result in the origin of the morphotypes of Tabby dentition.

Key words: tooth, mouse, *Eda*, Tabby, *Shh*, rudimentary tooth, early tooth development

Obsah

1	ÚVOD.....	10
1.1	ZUBY	10
1.1.1	Stavba zubu	11
1.1.2	Vývoj zubu.....	12
1.1.3	Specifické znaky zubu u myši	15
1.2	MOLEKULÁRNÍ MECHANIZMY ZUBNÍHO VÝVOJE	18
1.2.1	Úloha signalizačních center v zubním epitelu.....	19
1.2.2	Role Sonic Hedgehog (Shh) v odontogenezi.....	21
1.3	EDA DEFICIENTNÍ MYŠI (TABBY).....	22
1.3.1	Ektodysplasin (EDA)	22
1.3.2	Regulace Eda signální dráhy.....	24
1.3.3	Změny signalizace během vývoje zubu u Tabby.....	25
1.3.4	Embryonální vývoj zubů a výsledný fenotyp	26
2	CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE	30
3	MATERIÁL A METODY	31
3.1	CHOV EDA DEFICIENTNÍCH MYŠÍ	31
3.2	CHOV TRANSGENNÍCH MYŠÍ.....	32
3.2.1	Tabby-Shh(EGFP-cre)	32
3.2.2	Tabby-Rosa26LacZ.....	32
3.3	ZÍSKÁVÁNÍ EMBRYÍ A URČENÍ STÁŘÍ ZÁRODKU	33
3.4	WHOLE MOUNT IN SITU HYBRIDIZACE (WISH)	34
3.5	DETEKCE GALAKTOSIDÁZOVÉ AKTIVITY (BARVENÍ POMOCÍ X-GAL)	37
3.6	HISTOLOGICKÉ TECHNIKY	37
3.6.1	Zhotovení zmrazených řezů	37
3.6.2	Zhotovení parafínových řezů	38
3.6.3	Barvení histologických řezů jádrou červení.....	38
3.7	3D REKONSTRUKCE.....	39
4	VÝSLEDKY	40
4.1	ŘEZÁKOVÁ OBLAST	40
4.2	TVÁŘOVÁ OBLAST.....	43
4.2.1	ED 12,5.....	46
4.2.2	ED 13,5.....	47
4.2.3	ED 14,5.....	48
4.2.4	ED 15,0 – 15,5.....	49

4.2.5	<i>Analýza 3D rekonstrukcí</i>	50
5	DISKUZE	54
5.1	ŘEZÁKOVÁ OBLAST	54
5.2	TVÁŘOVÁ OBLAST	55
6	ZÁVĚR	60
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	61

Seznam použitých zkratk

AER	apikální ektodermální lišta
BMP	Bone morphogenetic protein
cDNA	complementary Deoxyribonucleic acid
Cre	Cre rekombináza
cRNA	complementary Ribonucleic acid
DEPC	Diethylpyrokarbonát
DIG	Digoxigenin
Dkk	Dickkopf-related protein
DI	Downless
ED	Embryonální den
EDA	Ectodysplasin
EDAR	Ectodysplasin receptor
EDARADD	EDAR adaptér s doménou smrti
EGFP	Enhanced Green fluorescent protein
EtOH	Ethanol
FGF	Fibroblast growth factor
Fgfr	Fibroblast growth factor receptor
GFP	Green fluorescent protein
Gli	Glioma-associated oncogene family zinc finger
h	hodina
HED	Hypohidrotická ektodermální dysplázie
HH	Hedgehog
HYB	hybridizační roztok
I κ K	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase
kb	kilo base pairs
Lef1	Lymphoid enhancer-binding factor 1
loxP	locus of chromosomal crossover (x) in the bacteriophage P1
M1	první molár (stolička)
MAB	Maleic Acid Buffer
mg	miligram
min	minuta
MS	Mesiální segment

Msx1	Msh homeobox 1
MT I	Tabby morfortyp 1
NF-κB	Nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B cells
obr	obrázek
Pax9	Paired box gene 9
PBS	Phosphate Buffered Saline
pEK	primary enamel knot
PFA	Paraformaldehyd
Ptc	Patched
R2	rudimentární zubní základ sousedící s M1
S	supernumerary tooth
SDS	Sodium dodecyl sulphate
SHH	Sonic hedgehog
Slit 1	Slit homolog 1
Smo	Smoothened
SOL	Solution (posthybridizační vymývací roztok)
SSC	Saline sodium citrate
T1	první zub v tvářové oblasti Tabby
Ta	Tabby
TGF β	Transforming growth factor β
TNF	Tumor necrosis factor
TRAF	TNF receptor-associated factor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	transfer Ribonucleic Acid
USA	United States of America
WISH	Whole mount In Situ Hybridizace
XEDAR	EDAR kódovaný X chromozomem
XLHED	X-Linked HED
ZPA	zóna polarizační aktivity
3D	three-dimensional

1 Úvod

Zuby jsou pro většinu savců velmi důležitým orgánem. Ačkoli jsou zubní vady slučitelné se životem, nedokonalá dentice způsobuje organismu problémy s příjmem potravy, které snižují fitness jedince a tím ho znevýhodňují v konkurenci s okolím. Pro člověka mají vady dentice nejen funkční, ale také estetický význam.

Vyvíjející se myší zub je jedním z modelů pro studování obecných zákonitostí vývoje orgánů, založeném na interakcích mezi epitelem a mezenchymem jako jsou vlasy, slinné, potní a mléčné žlázy nebo plíce. Zároveň je ideálním modelem pro studium odontogeneze. Stále lépe se daří kultivovat embryonální zubní základy *in vitro* a navíc je i transplantovat zpět do organismu za vzniku mineralizovaného zubu (Honda et al., 2007). Tyto pokusy slibují do budoucna velký pokrok v oboru regenerativní medicíny a vzniku biologických zubních náhrad (Yen and Sharpe, 2008).

Ideální model činí z vyvíjející se myší dentice skutečnost, že se skládá ze dvou typů zubních základů. První typ základů dá vznik funkčním zubům, zubní základy druhého typu zastaví svůj růst v průběhu embryonálního vývoje a na jejich místě vznikne bezzubá oblast nebo se stanou součástí funkčního zubu. V jedné čelisti tak můžeme sledovat různá vývojová stadia zubů s různými osudy současně a přesně tak porovnávat účinky faktorů, které vývoj regulují. Myši s poruchami genů nám navíc umožňují objasňovat funkce jednotlivých genů, jejich produktů a signálních drah. Například *Eda* deficientní myši (Tabby) vykazují ve své dentici jak nadpočetné, tak chybějící zuby. Příčinou je změna regulace jejich vývoje vlivem mutace genu pro protein ektodysplasin. Cestou k pochopení role ektodysplasinu v odontogenezi je odhalení zákonitostí uplatňujících se při vzniku zubů u myši Tabby a následné srovnání s normálním vývojem zubů u myši.

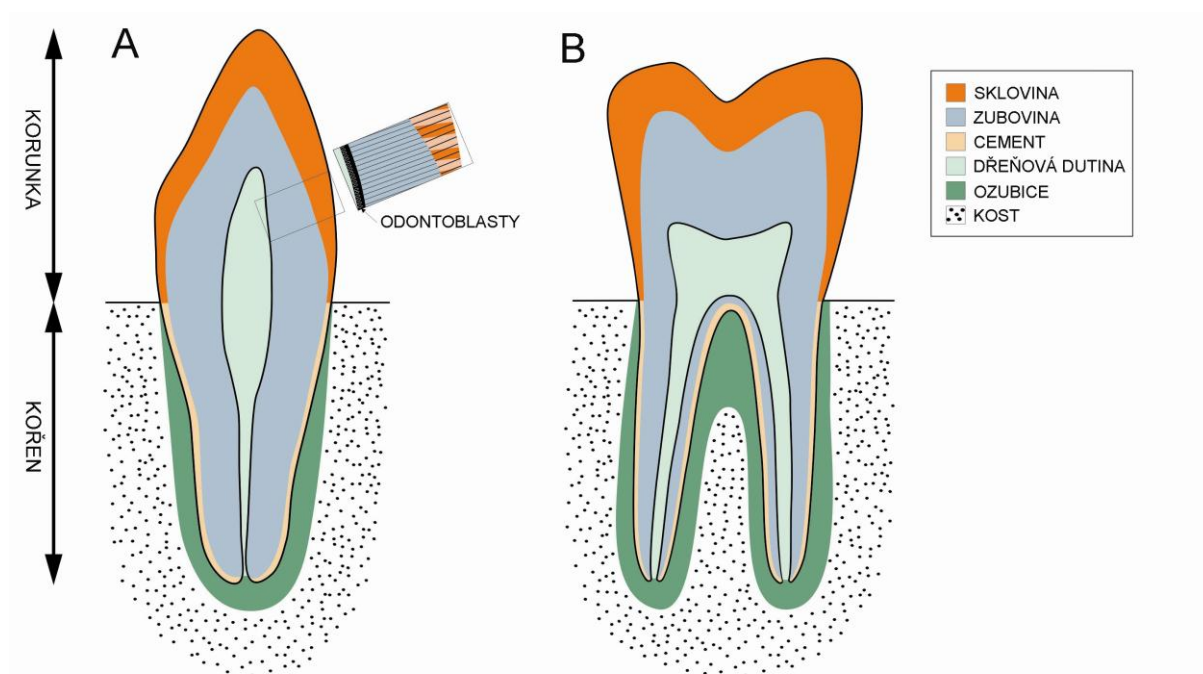
1.1 Zuby

Zuby jsou fylogeneticky velmi staré útvary specifické pro ústní dutinu obratlovců. Jde o ektodermální deriváty vznikající interakcí epitelu ektodermálního původu (lokalizovaného na povrchu horní a dolní čelisti) s ektomezenchymem (pocházejícím z buněk neurální lišty). Obdobný vývoj založený na pučení epitelu a jeho interakci s mezenchymem mají i další

ektodermální deriváty, mezi něž patří například šupiny, peří, chlupy, kožní žlázy (včetně mléčné) a slinné žlázy.

1.1.1 Stavba zubu

Zub má 3 hlavní části. Korunku vyčnívající z dásně do dutiny ústní, krček obklopený dásní a kořen. Kořenů může být v závislosti na typu zubu i více. Jsou uloženy v kostěném zubním lůžku čelisti zvaném alveolus a jejich upevnění zajišťuje pojivová tkáň – ozubice (periodontium). Uvnitř každého zubu se nachází dřeňová dutina vyplněná zubní dření s cévami a nervy. Zub je tvořen třemi typy tvrdých tkání – zubovinou, sklovinou a zubním cementem (obr. 1).



Obrázek 1. Stavba zubu. (A) Řezák (jednohrbolkový zub). (B) Stolička (vícehrbolkový zub).

Zubovina – dentin je hlavní hmota zubu obklopující dřeňovou dutinu. Vzniká činností odontoblastů, které zasahují do dentinu svými cytoplazmatickými výběžky nazývanými Tomesova vlákna. Odontoblasty vytvářejí základní hmotu dentinu složenou z proteoglykanů a kolagenu. Dentin má vysoký podíl anorganické hmoty (až 70%) a proto je tvrdší než kost. Zároveň však zůstává pružný.

Sklovina – enamelum kryje povrch korunky zubu. Je nejtvrdší hmotou v lidském těle, neboť obsahuje 96 – 97% minerálních látek (hlavně hydroxyapatit). Organickou složku skloviny

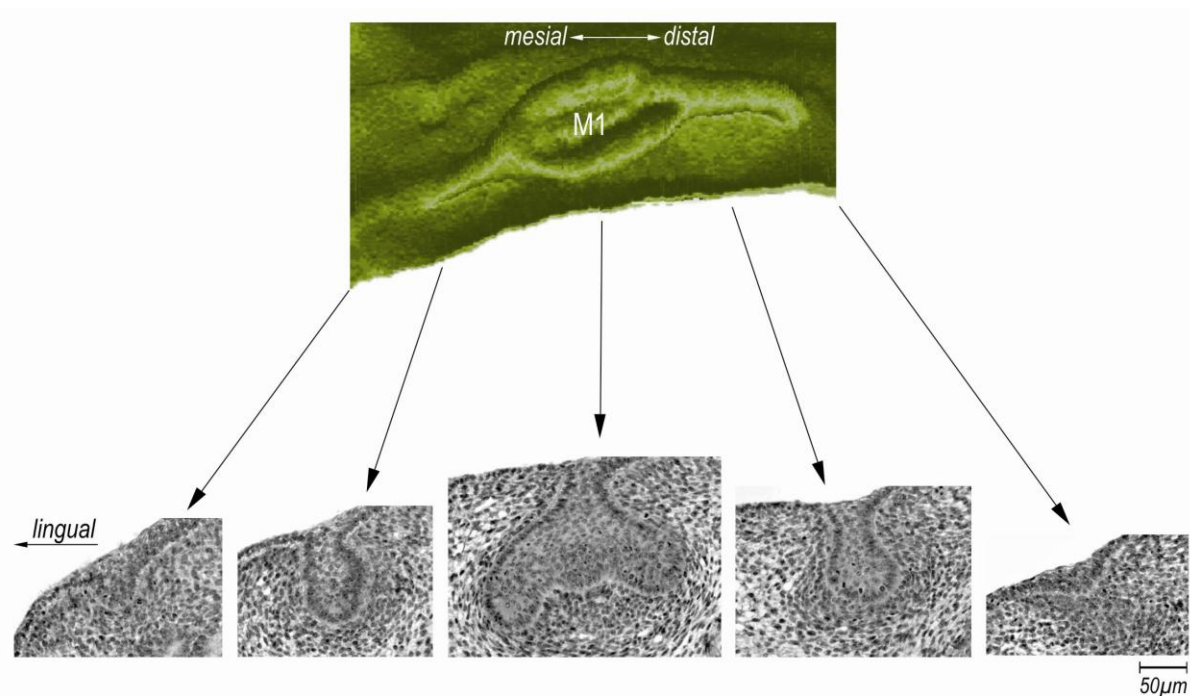
produkují ameloblasty, podílející se zároveň na její mineralizaci. Základní organická hmota skloviny je tvořena proteiny neobsahujícími kolagen. Patří mezi ně amelogeniny a enameliny.

Zubní cement je modifikovaná vláknitá kost, chudá na kostní buňky. Pokrývá krček a kořen zubu. S povrchem dentinu je cement spojený kolagenními vlákny, která jsou součástí cementu a zajišťují jeho spojení s kostí alveolu. Cement obsahuje 46 – 50% minerálních látek.

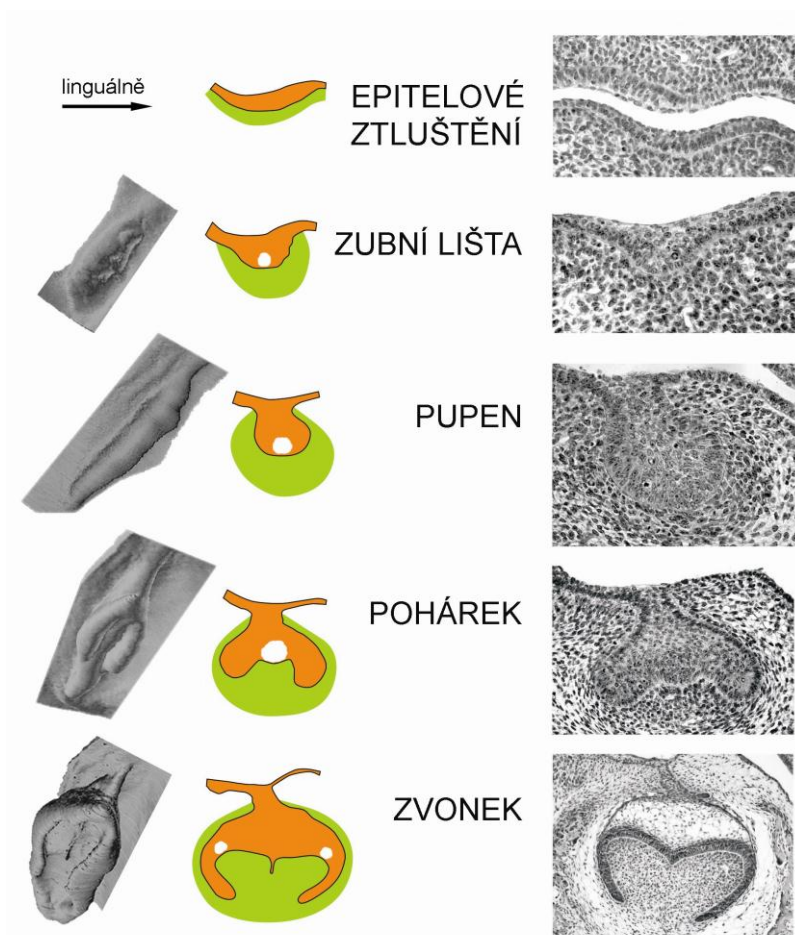
Podle vnějšího vzhledu a funkce se jednotlivé zuby savců rozlišují na řezák (incisor, I), špičák (caninus, C), zub třenový (premolar, P) a stoličku (molar, M). Dále můžeme rozlišovat 2 generace zubů, zuby mléčné, neboli dočasné, a zuby stálé.

1.1.2 Vývoj zubu

Zubní vývoj je řízen vzájemnými interakcemi mezi epitelem ektodermálního původu a ektomezenchymem, které od sebe odděluje bazální membrána. Zub prochází během svého vývoje několika stádii, pojmenovanými podle tvaru zubního epitelu na frontálním průřezu v nejširším místě zubního základu (obr. 3). Počátek a konec epitelu zubního základu však tomuto tvaru odpovídat nemusí (obr. 2).



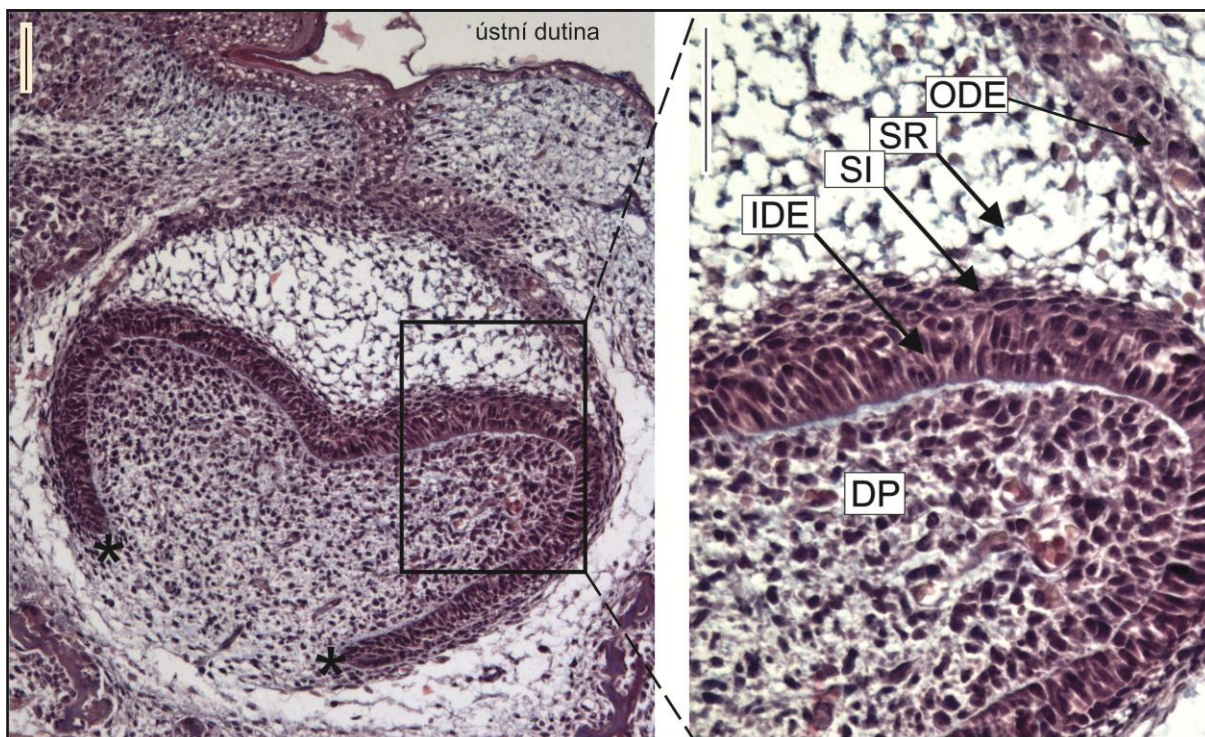
Obrázek 2. Změny tvaru zubního epitelu podél předozadní osy čelisti. Nahoře: 3D rekonstrukce ukazuje z mezenchymové strany zubní a přilehlý ústní epitel tvářové oblasti dolní čelisti myšního embrya. Dole: frontální histologické řezy různými místy zubního epitelu podél předozadní osy ukazují odlišný tvar v závislosti na místě.



Obrázek 3. Stádia zubního vývoje stoličky (M1) u myši. (A) 3D rekonstrukce znázorňují uspořádání zubního a přilehlého ústního epitelu. (B) Nákres frontálního řezu ukazuje tvar zubního epitelu v centrální části 3D modelu. Zelená barva znázorňuje zubní mezenchym, zubní epitel je oranžový. Bílá znázorňuje signální centra. (C) Frontální histologické řezy. (Upraveno podle Peterkova et al., 2002b).

První morfologickou známkou vývoje zubu je ztlustění ústního epitelu a vznik zubní lišty (dentální laminy), v jejímž okolí dochází ke kondenzaci mezenchymu. Zubní lišta postupně vrůstá do přilehlého mezenchymu prvního žaberního oblouku a dává vznik zubním pupenům. Buňky po stranách pupene proliferují, vrůstají dále do mezenchymu, a vytvoří okraj sklovinného orgánu (cervical loop). Toto stádium nazýváme zubní pohárek. Epitel z vrcholku bývalého pupenu se dostává do vnitřní části pohárku a dává vznik sklovinnému uzlu (enamel knot) (Butler, 1956), oblasti s množstvím apoptotických buněk a tělísek (Lesot et al., 1996). Buňky tohoto tzv. primárního sklovinného uzlu dočasně ztrácejí schopnost proliferace (Jernvall et al., 1994) a produkují růstové faktory a signální molekuly charakteristické pro známá signální centra savců (notochord, AER, ZPA) (Vaahtokari et al., 1996a). Proto je sklovinný uzel označován za signalizační centrum vývoje zubu (Jernvall et al., 1994). Mezenchym zanořený v dutině pohárku se nazývá zubní papila. Na tomto stádiu můžeme v rámci epitelu rozlišit tři skupiny buněk – vnitřní sklovinný epitel, zevní sklovinný epitel a

hvězdčité retikulum (stellate reticulum). Vnitřní a zevní sklovinný epitel v sebe přecházejí na okraji zubního pohárku v místě označovaném cervical loop. Pohárek se postupně zvětšuje a přeměňuje na zubní zvonek (s diferencovaným stratum intermedium) (obr. 4).

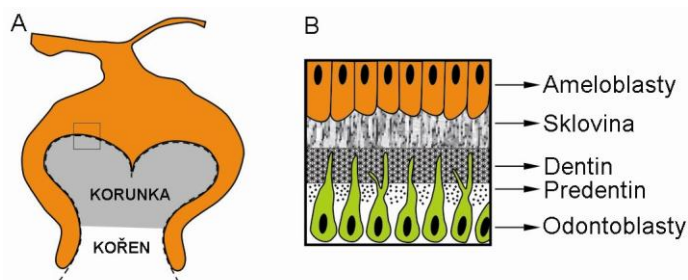


Obrázek 4. Stádium zvonku. Frontální histologický řez první stoličkou dolní čelisti myši na ED 17,5.

Zubní epitel má tvar zvonku, uvnitř se nachází mezenchymová zubní papila. Zubní vak je patrný jako světlá tkáň obklopující zvonek. Hvězdičky značí okraj sklovinného orgánu – cervical loop. Výřez ukazuje detailní pohled na rozhraní mezi vnitřním zubním epitelem (IDE) a zubní papilou (DP). Epitel lze rozlišit na vnitřní sklovinný epitel (IDE), vnější sklovinný epitel (ODE), hvězdčité retikulum (SR) a stratum intermedium (SI). Měřítko ukazuje 50µm.

Ve stádiu časného zvonku dochází k iniciaci vývoje zubních hrbolků. Bazální membrána mezi zubní papilou a vnitřním sklovinným epitelem určuje svým tvarem morfologii korunky zubu. Cervical loop se během stádia zvonku prodlužuje a dále vymezuje mezenchym zubní papily. Buňky přilehlé k bazální membráně ze strany mezenchymu zubní papily podstupují terminální diferenciaci za vzniku odontoblastů, buňky přilehlé ze strany vnitřního zubního epitelu diferencují za vzniku ameloblastů. Buňky vystupují z buněčného cyklu, prodlužují se, dochází k polarizaci jádra a dalších organel a nakonec k produkci zubních tkání, dentinu a skloviny. V průběhu terminální diferenciaci ameloblastů a odontoblastů dochází k řadě recipročních tkáňových interakcí. Nejprve odontoblasty pocházející z buněk dentální papily začnou produkovat predentin (kolagenní extracelulární matrix, jejíž kalcifikací vzniká dentin). Po vzniku první vrstvy predentinu začínají na jeho povrch přilehlé ameloblasty pocházející z buněk vnitřního zubního epitelu produkovat enamelovou matrix. Ta se mineralizací mění na

nejtvrdší tkáň v těle – sklovinu (obr. 5). Diferenciace ameloblastů je prostorově shodná s diferenciací odontoblastů, je však o 12 až 36 hodin opožděná (Ruch, 1984).



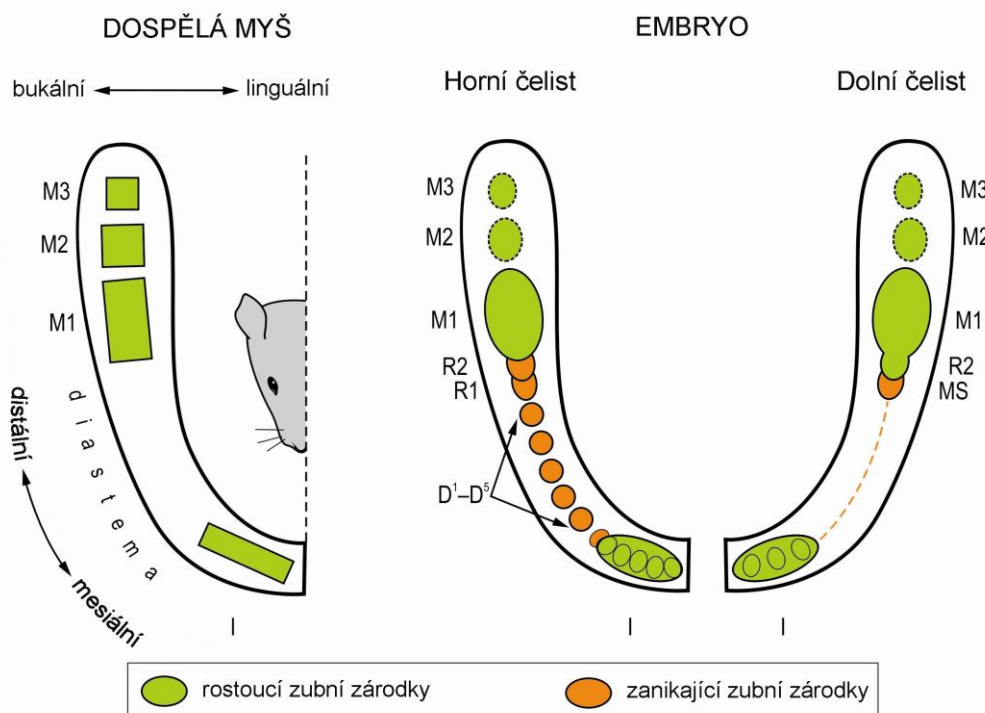
Obrázek 5. Stádium zvonku – tvrdé tkáně. (A) V pozdním stádiu zvonku se cervical loop dále prodlužuje a podílí se na vzniku kořene. Funkční diferenciace specifických buněk je iniciována podél linie (čárkovaně) kontaktu epitelu (oranžová) a mezenchymu (šedá). (B) Detailní znázornění uspořádání ameloblastů, odontoblastů a tkání, které produkují.

V pozdním stádiu zvonku růst cervical loop pokračuje, tvoří se Hertwigova epitelová kořenová pochva, která se účastní vývoje zubního kořene. Z mezenchymu obklopujícího zubní základ se vytváří zubní vak. Z buněk zubního vaku se diferencuje parodont, k němuž se počítá zubní cement, buňky a vazivo vyplňující periodontální štěrbinu (periodontium) a kostěnná stěna zubního alveolu. V době, kdy se zub začíná prořezávat do ústní dutiny, mizí buňky sklovinného orgánu zahrnující ameloblasty, stratum intermedium a stellate reticulum. Odontoblasty (na rozdíl od ameloblastů) setrvávají na okraji dřeňové dutiny po celý život zubu a produkují další vrstvy predentinu a dentinu. Tím se dřeňová dutina průběžně zmenšuje. Pomocí výběžků prostupujících celou vrstvou dentinu až ke sklovině napomáhají mineralizaci predentinu a jeho přeměně na dentin. Odontoblasty mají také mechanosenzorickou funkci (Magloire et al., 2009).

1.1.3 Specifické znaky zubu u myši

Myší funkční dentice je v porovnání s ostatními savci velmi redukovaná. Předpokládá se, že zuby předchůdců dnešních savců obsahovaly v každém zubním kvadrantu tři řezáky, jeden špičák, čtyři zuby třenové a tři stoličky. Všechny zuby až na stoličky se jednou za život obměnily. Myši mají pouze jednu generaci zubů a každý zubní kvadrant obsahuje pouze jeden řezák a tři stoličky. Mezi nimi se nachází diastema – bezzubá oblast, kterou u jiných savců vyplňují zbývající řezáky, špičák a třenové zuby. V embryonálním vývoji však diastema myši obsahuje rudimentární zubní základy, které během vývoje zanikají nebo se podílejí na vzniku funkčních zubů (Peterkova et al., 1996; Peterkova et al., 2002b; Peterkova et al., 1995) (obr. 6). V dolní čelisti jsou nejvýraznější dva velké pupeny v posteriorní části diastemy

označované jako MS (mesiální segment) a R2 (Viriot et al., 2000) (obr. 6). Tyto pupeny nejspíš odpovídají třenovým zubům, které myši ztratily během evoluce (Peterkova et al., 2000; Viriot et al., 2002).



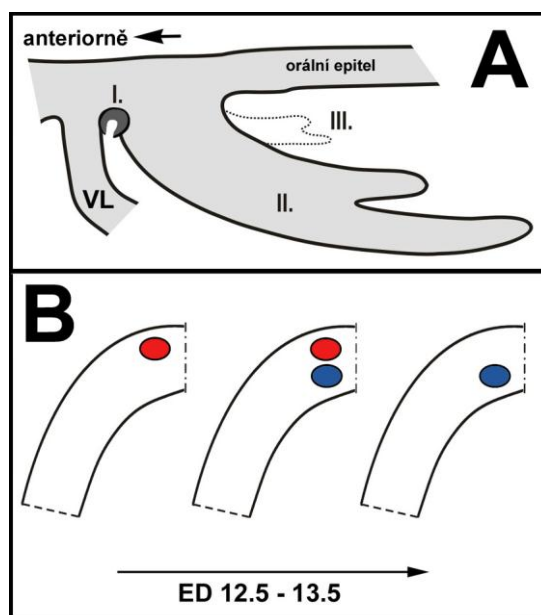
Obrázek 6. Porovnání funkčního a embryonálního zubního vzorce u myši. Vlevo: Funkční dentice dospělé myši. Každý čelistní kvadrant obsahuje jeden řezák (I), bezzubou diastemu a tři moláry (M1, M2, M3). Vpravo: Uspořádání zubních základů v myším embryu. V horní čelisti je pupen řezáku tvořen splynutím pěti až šesti primordií. Horní diastema obsahuje pět malých pupenů (D1-D5) a dva velké pupeny (R1, R2). V dolní čelisti splývají tři primordia v oblasti řezáku. V přední (mesiální) části diastemy lze nalézt jen epitelové ztlusnění (přerušovaná čára), v distální části se nacházejí dva velké pupeny (MS, R2). R2 je postupně inkorporován do přední části prvního moláru (M1). Základy druhého a třetího moláru (M2 a M3) se objevují na pozdějších stádiích vývoje. (Upraveno podle Peterkova et al., 2000).

Stoličky mají u myši na vrcholku každého hrbolku oblast, která není pokryta sklovinou. Řezáky myším neustále rostou, a protože sklovina je ukládána jen na labiální straně, obrušováním linguální strany se udržuje jejich řezná hrana.

1.1.3.1 Vývoj řezáků v dolní čelisti

Na rozdíl od horní čelisti, kde se během embryonálního vývoje tvoří v řezákové oblasti 5-6 morfologicky rozpoznatelných plakod (Peterkova et al., 1993), můžeme v řezákové oblasti dolní čelisti zaznamenat pouze 3 plakody (Peterkova et al., 2002b) (obr. 6). Avšak během embryonálního vývoje byl v řezákové oblasti popsán také rudimentární (označován také mléčný, dočasný) řezák (Fitzgerald, 1973; Woodward, 1894), který se objevuje na labiální

straně vyvíjejícího se funkčního zubu. Neobsahuje sklovinu ani diferencovaný sklovinný orgán, ale jde o vrstvu dentinu, přilehlou k diferencovaným odontoblastům (Fitzgerald, 1973). Tento zub se svou morfologií a místem vzniku podobá rudimentárním zubům plazů a proto může být označován jako prelakteální, zatímco funkční řezák odpovídá lakteální (mléčné) dentici (Peterkova et al., 2002b). Přítomnost dvou generací zubních základů u myši potvrdila i exprese *Shh* v dolní čelisti na ED 11,5 – 13,5 (*Shh* exprese je obecně považována za marker časného zubního vývoje). V řezákové oblasti se postupně objevují dvě signální domény *Shh*. První, umístěná anteriorně a na povrchu epitelu, odpovídá prelakteálnímu řezáku. Druhá, posteriorní, která je v epitelu hlouběji pod povrchem, patří funkčnímu (lakteálnímu) řezáku (Hovorakova et al., 2011) (obr. 7). Ve všech předešlých pracích však byly tyto *Shh* signální domény považovány za totožnou oblast a proto automaticky přisuzovány funkčnímu řezáku (Kangas et al., 2004; Munne et al., 2010).



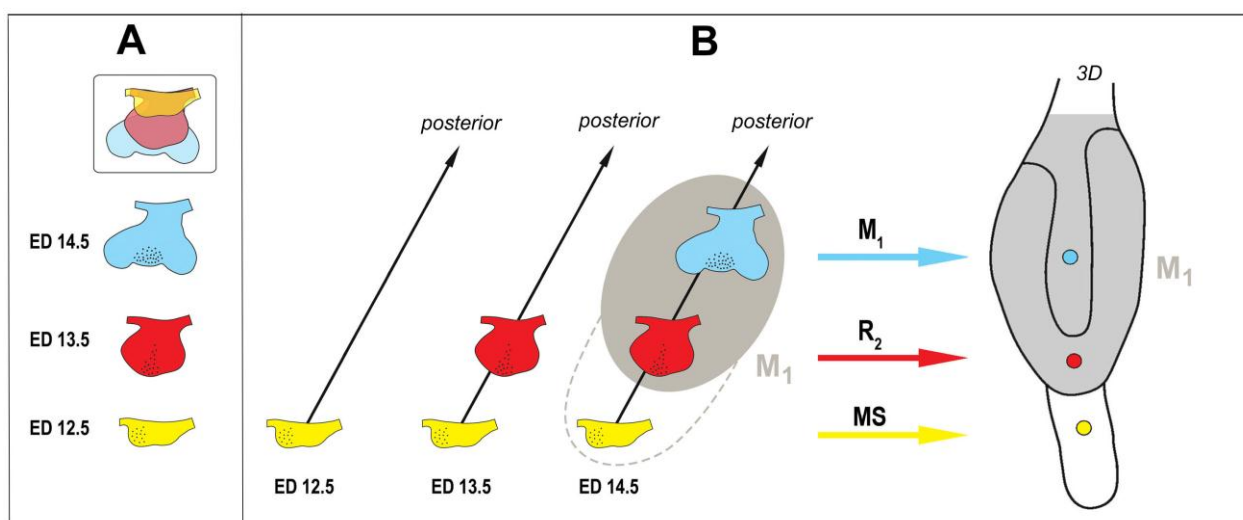
Obrázek 7. Orientační schéma znázorňující vývojový potenciál myši formovat tři generace zubů.

(A) Sagitální řez dolní čelisti myši. Prelakteální zub I., funkční zub II., náhradní zub III. Vestibulární lišta (VL). (B) Schéma shrnující časoprostorové uspořádání *Shh* exprese v řezákové oblasti dolní čelisti u myši. Červená značí anteriorní doménu patřící prelakteálnímu zubu (I.), modrá značí posteriorní doménu funkčního řezáku (II.). (Převzato z Hovorakova et al., 2011)

1.1.3.2 Embryonální vývoj tvářových zubů dolní čelisti

Do embryonálního dne 12,5 je nejvýraznější strukturou tvářové oblasti dolní čelisti rudiment MS, který vlivem apoptózy přestává růst a přeměňuje se v epitelovou lištu. Na ED 13,0 se distálně od MS začíná objevovat R2, jenž dominuje tvářové oblasti až do ED 14,0. Tento pupen je inkorporován do přední části prvního moláru (M1) a podílí se tak na jeho vzniku.

M1 je dominantní strukturou tvářové oblasti od ED 14,5 (Prochazka et al., 2010; Viriot et al., 2000). Všechna tato primordia exprimují geny z rodin SHH, FGF, BMP, Lef1, avšak vzhledem k odlišnému osudu (MS a R2 zaniknou, M1 se vyvine ve funkční zub), mají tyto stejné geny různé funkce v závislosti na čase, kvantitativních aspektech a jejich vzájemné kombinaci (Peterkova et al., 2000; Prochazka et al., 2010). Dlouhou dobu však byla veškerá signalizace na časných stádiích vývoje zubů v dolní čelisti přisuzována M1 (obr. 8). Skutečnost, že signalizace v tvářové oblasti na časných stádiích patří každý ED jinému zubnímu základu, byla prokázána teprve nedávno (Prochazka et al., 2010).



Obrázek 8. Schéma časného vývoje zubů v tvářové oblasti dolní čelisti u myši. Na jednotlivých embryonálních dnech (ED) 12,5; 13,5; 14,5 jsou charakteristické tvary zubního epitelu na frontálních řezech znázorněny barevně. (A) Původní interpretace. Nejpokročilejší zubní základ na každém ED 12,5, 13,5 a 14,5 je vždy automaticky považován za první stoličku (M1), která postupně roste a diferencuje se (v rámečku). (B) Nově potvrzená interpretace na základě existence rudimentárních premolárových zubních základů. Charakteristické tvary zubního epitelu na frontálních řezech odpovídají přednímu rudimentárnímu pupenu (MS – žlutě, na ED 12,5), zadnímu rudimentárnímu pupenu (R2 – červeně, v ED 13,5), a prvnímu moláru (M1 – modře, na ED 14,5). Konečná lokalizace těchto struktur je znázorněna odpovídající barvou teček v 3D rekonstrukci zubního epitelu na ED 14,5 (3D). Šedá barva ukazuje rozsah pohárku M1 (Upraveno podle Peterkova et al., 2005).

1.2 Molekulární mechanismy zubního vývoje

Interakce mezi buňkami a tkáněmi představují ústřední mechanismus regulace vývoje všech mnohobuněčných organismů. Pro embryonální vývoj jsou nejspecifičtější parakrinní interakce. I vývoj zubů je řízen komplexním působením signálních molekul, transkripčních faktorů, růstových faktorů a jejich receptorů, které se uplatňují podobně jako v dalších orgánech utvářených pod vlivem interakcí mezi epitelem a mezenchymem. Parakrinní signální molekuly z rodin FGF, HH, TGF β , WNT a TNF jsou zahrnuty v různých stádiích organogeneze a jsou také klíčovými molekulami regulujícími vývoj zubu (Pispa and Thesleff,

2003-review) (obr. 9). Protože většina důležitých signálních molekul ze jmenovaných rodin reguluje velké množství vývojových procesů v různých tkáních a orgánech, je třeba přísná časoprostorová kontrola jejich exprese, která ve spojení s konkrétní tkání a kombinací signálů specificky zajistí správný vývoj cílové struktury.

1.2.1 Úloha signalizačních center v zubním epitelu

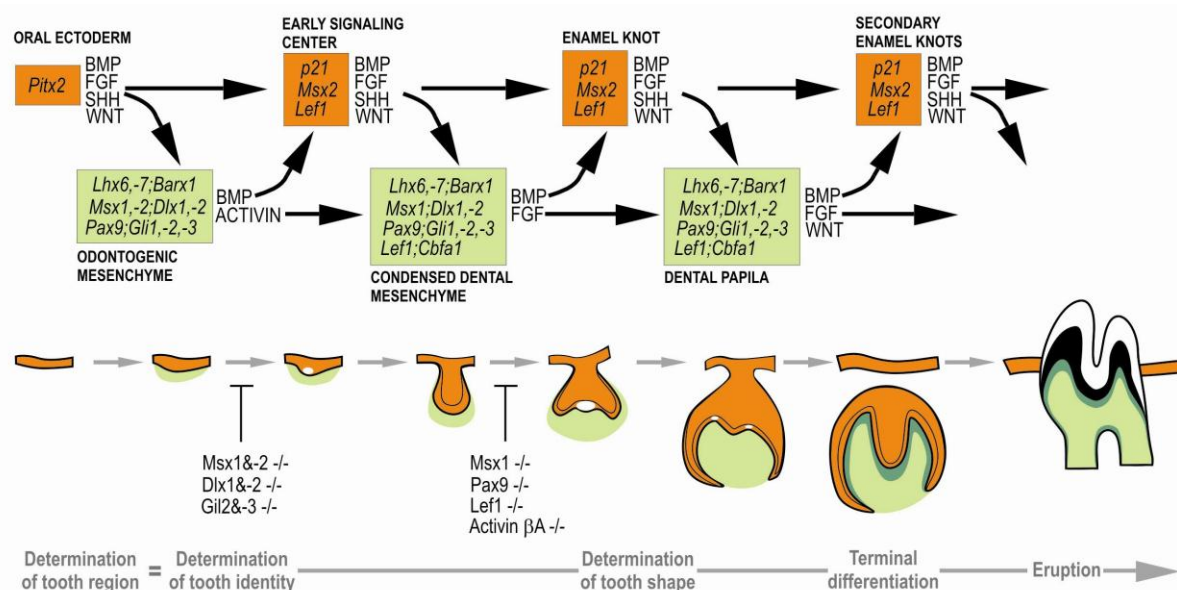
Vývoj zubu iniciuje ústní epitel. Pouze buňky ektodermu pocházející z derivátů prvního žaberního oblouku mají schopnost indukovat odontogenezi a to i v případě, že mezenchym nepochází z prvního žaberního oblouku (Mina and Kollar, 1987). Rekombinační experimenty na myších embryích ukázaly, že od ED 9,0 jsou signály z epitelu nutné pro správný vývoj zubního základu. Od ED 11,5 se však odontogenní potenciál přesouvá z epitelu do mezenchymu, který je schopen indukovat zubní vývoj i v kombinaci s nedentálním epitelem, zatímco dentální epitel tuto funkci ztrácí (Lumsden, 1988; Mina and Kollar, 1987). Na ED 12 se začíná viditelně formovat pupen, na jehož vrcholu dochází k intenzivní expresi signálů, pocházejících ze všech rodin signálních molekul důležitých pro vývoj (BMP, HH, FGF, WNT). Současně se exprimují i další geny spojené se signalizací (*p21*, *Msx2*, *Lef1*). Toto přechodné časné signální centrum tvoří podskupina buněk formující pupen (viz. literární přehled Jernvall and Thesleff, 2000). Dnes již víme, že nejde o pupen budoucího M1, nýbrž o rudiment MS na ED 12,5 a R2 na ED 13,5 (Prochazka et al., 2010). Okolo ED 14,5 se centrem signalizace zubního vývoje stává sklovinný uzel (Vaahtokari et al., 1996a).

Sklovinný uzel (enamel knot) je znám více nežli sto let jako přechodná populace epitelových buněk, které tvoří těsný shluk ve středu zubního pohárku, a těsně sousedí s mezenchymovými buňkami zubní papily (Butler, 1956). Tento sklovinný uzel je označován jako primární (pEK) a je považován za signální centrum vývoje pohárku savčího zubu (Jernvall et al., 1994), protože je zdrojem řady signálních molekul. Patří mezi ně SHH, BMP-2, -4, -7, FGF-4, -9, Lef1, Msx2, p21, WNT-3, -6, -10a, -10b (Jernvall and Thesleff, 2000-review; Vaahtokari et al., 1996a). Buňky sklovinného uzlu tedy exprimují řadu signálních molekul, samy však neproliferují, pravděpodobně kvůli nedostatku FGF receptorů (Jernvall et al., 1994). Buňky sklovinného uzlu jsou považovány za specifickou buněčnou populaci, jejímž konečným osudem je zánik poté, co splnila svůj signalizační úkol (Vaahtokari et al., 1996b) (obr. 9). Exprese *p21* předchází úniku buněk sklovinného uzlu z buněčného cyklu ve stádiu pozdního pupenu, setrvává ve stádiu pohárku a mizí zároveň se sklovinným uzlem (Jernvall et al., 1998). Jelikož primární sklovinný uzel vzniká v období, kdy je vývoj zubu řízen

mezenchymem, dá se předpokládat, že zubní mezenchym bude tvorbu sklovinného uzlu regulovat (Thesleff and Jernvall, 1997-review). *Bmp-4* je exprimován v zubním mezenchymu ve stádiu pupene a indukuje expresi *p21* a *Msx2* - molekul charakteristických pro sklovinný uzel. Proto se předpokládá, že BMP-4 indukuje vznik sklovinného uzlu (Jernvall et al., 1998). Podobně activin z mezenchymu indukuje expresi genu *Edar*, který je pro sklovinný uzel rovněž charakteristický (Laurikkala et al., 2001). Pokusy s *Msx1* deficientními myši (u kterých se vývoj zubního základu zastaví na stádiu pupenu) ukázaly, že přidání BMP-4, který indukuje vznik sklovinného uzlu, dokáže částečně zachránit vývoj jejich zubních základů in vitro (Bei et al., 2000). Předpokládá se, že za normálních podmínek indukuje *Msx1* vznik BMP-4 v zubním mezenchymu (Chen et al., 1996). Výše uvedená data o sklovinném uzlu a molekulárních aktivitách na stádiu zubního pupene M1 na ED 13,5 (obr. 9) bude nutné reinterpretovat. Přinejmenším část těchto údajů se totiž nevztahuje k M1, nýbrž k rudimentárnímu pupenu R2 (Prochazka et al., 2010) (obr. 8).

Primární sklovinný uzel ve stádiu pozdního pohárku (ED 15) vlivem apoptózy zaniká (Lesot et al., 1996; Vaahtokari et al., 1996b). V mnohohrbolkových zubech se ve stádiu zvonku vytváří několik sekundárních sklovinných uzlů v místech budoucích zubních hrbolků. Stejně jako primární, ani sekundární sklovinné uzly neproliferují a exprimují *Fgf-4* (Jernvall et al., 1994). Jejich funkcí je iniciace formování jednotlivých zubních hrbolků (Vaahtokari et al., 1996a). Sekundární sklovinné uzly zanikají na pozdních prenatalních stádiích, kdy jejich buňky podléhají apoptóze (Vaahtokari et al., 1996b). Primární i sekundární sklovinné uzly se podílejí na formování zubních hrbolků, které později určují specifický tvar korunky každého zubu (Jernvall et al., 1994).

Po vymizení FGF-4 signálu z oblastí sekundárního sklovinného uzlu, zůstává v těchto místech exprimován nedávno objevený marker sklovinného uzlu *Slit1* a předpokládá se, že jeho exprese vymezuje buňky terciárního sklovinného uzlu. Terciární sklovinný uzel se jako další typ signálního centra vyskytuje na vrcholcích zubních hrbolků, je charakteristický pro dobu, kdy dochází ke kalcifikaci zubů a nejspíš hraje roli v regulaci definitivního tvaru korunky zubu a formování tvrdých tkání (Luukko et al., 2003).



Obrázek 9. Schematický přehled signálů, regulujících zubní morfogenezi. V horní části obrázku jsou znázorněny molekulární kaskády, v dolní části odpovídající morfologická stadia vývoje zubu. Pod stádiem epitelového ztlustění a zubního pupene jsou vyznačeny molekuly, jejichž absence u myších mutantů vyvolala zastavení vývoje zubu ve znázorněném morfologickém stádiu. Oranžově je označen zubní epitel, v něm bíle sklovinné uzly, zeleně zubní mezenchym. (Převzato z Jernvall and Thesleff, 2000).

1.2.2 Role Sonic Hedgehog (*Shh*) v odontogenezi

V zubních základech myších embryí byla z ligandů Hedgehog (HH) rodiny nalezena pouze exprese Sonic hedgehog (*Shh*) omezená na buňky zubního epitelu. Cílem *Shh* signalizace ve vyvíjejícím se zubu je však epitel i mezenchym (Dassule et al., 2000). Poprvé se exprese *Shh* objevuje ve stádiu epitelového ztlustění, kde podporuje buněčnou proliferaci a určuje tak místo invaginace epitelu do přilehlého mezenchymu a tím i místo formování zubu. Hranice mezi zubním a ústním epitelem je kontrolována vzájemnými interakcemi mezi *Shh* (v zubním epitelu) a *Wnt7b* (v ústním epitelu) (Sarkar et al., 2000). *Shh* exprese pokračuje i v dalších stádiích, ale omezuje se na vrcholek zubního pupenu a na oblast sklovinných uzlů, vnitřní sklovinný epitel a buňky stratum intermedium (Cobourne et al., 2004; Keranen et al., 1998). Přítomnost SHH proteinu byla lokalizována i v buňkách mezenchymu, přiléhajících k pupenu i pohárku (Cobourne et al., 2004). *Lef1*, který aktivuje cílové geny během Wnt signalizace, aktivuje *Fgf-4* v epitelu, ten indukuje expresi *Fgf-3* a *10* v mezenchymu a ty indukují expresi epitelového *Shh* (Kratochvil et al., 2002). *Shh* indukuje expresi *Ptc* a *Gli*, inhibuje expresi *Wnt10b* a neindukuje expresi *Bmp-4* (Dassule and McMahon, 1998). Molekuly *Ptc*, *Smo* i *Gli* jsou exprimovány v epitelu i mezenchymu vyvíjejícího se zubu (Hardcastle et al., 1998).

Pokus, kde byla odstraněna *Shh* aktivita v počátku růstu zubního epitelu ukázal, že *Shh* reguluje růst a určuje tvar zubu, nemá však vliv na diferenciaci ameloblastů a odontoblastů (Dassule et al., 2000). Schopnost noggin zachránit expresi *Shh* dokazuje, že exprese *Shh* je reprimována molekulami BMP (Pummila et al., 2007).

Vzhledem k výše zmíněným faktům je *Shh* všeobecně uznáván jako jeden z markerů signálních center vyvíjejících se zubů.

1.3 *Eda* deficientní myši (Tabby)

Eda deficientní myši (Tabby) vznikly spontánní mutací. Konkrétně jde o delecii 2 kb v 5'oblasti *Eda* (*Tabby*) genu který se nachází na chromozomu X (Ferguson et al., 1997; Srivastava et al., 1997). Heterozygotní samice *Eda* deficientních myši mají pruhovanou „mourovatou“ srst. Tabby, v překladu do češtiny „mourovatý“, je tedy výstižné označení myši s delecí v tomto genu.

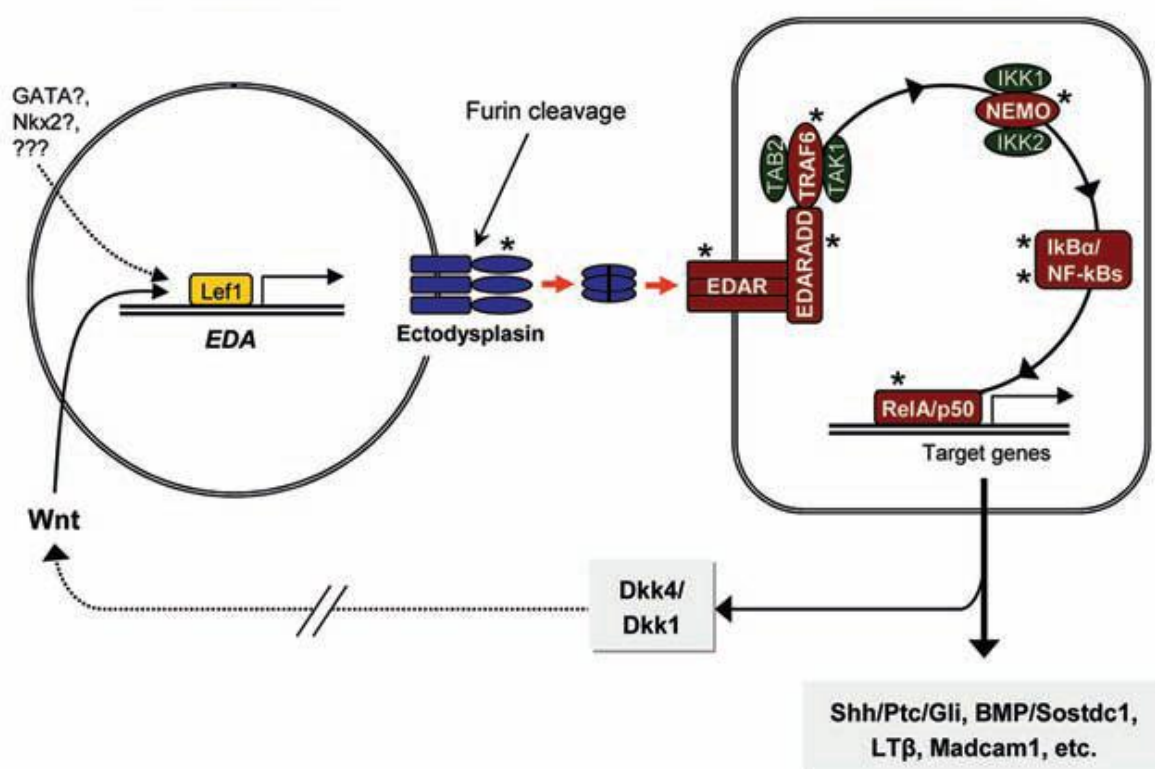
Porucha *Eda* genu a dalších molekul účastnících se stejné signální dráhy způsobuje syndrom hypohidrotické ektodermální dysplázie (HED). U člověka popsal tento syndrom v roce 1875 Charles Darwin a později byl popsán také u myši (Falconer, 1952). Projevuje se abnormálním vývojem ektodermálních derivátů, jako jsou zuby, vlasy a exokrinní žlázy (např. potní). Existuje několik forem HED. První, vázaná na X chromozom (XLHED), je způsobena mutací přímo v *Eda* genu (*Ta* u myši) (Kere et al., 1996). Další formy HED jsou vázány autozomálně a jsou způsobeny mutacemi v genu pro receptor *Edar* (myši geny *Downless*^{Jackson}, *Downless*^{Sleek}, *Dl*) (Headon and Overbeek, 1999) a pro adaptorový protein EDARADD (u myši kódován genem *Crinkled*) (Headon et al., 2001).

Tabby homo/hemizygotní myši mají hnědou řídkou srst, lysiny za ušima, často ocas se zalomením na špičce a četné vady dentice (Grüneberg, 1965).

1.3.1 Ektodysplasin (EDA)

Ektodysplasin (EDA) patří do rodiny proteinů označovaných tumor necrosis factor (TNF), regulujících mnoho buněčných dějů, jako jsou apoptóza, imunita, organogeneze a buněčné přežití. Existují dvě sestřihové varianty genu *Eda*: *Eda-A1* a *Eda-A2* (Bayes et al., 1998). Obě kódují transmembránový protein typu II (jeho N-konec je orientován do buňky), nacházející se v buňce ve formě trimerů, který je aktivován odštěpením z plasmatické membrány. Ligand

EDA-A1 se účastní EDA-A1 signální dráhy spolu s receptorem EDAR (Ectodysplasin receptor) a adaptérem obsahujícím doménu smrti EDARADD (EDAR adapter with death domain). Druhá známá signální dráha zahrnuje EDA-A2 ligand (lišící se od EDA-A1 pouze ve 2 aminokyselinách) a receptor XEDAR jehož doména je podobná doméně EDAR (Yan et al., 2000). Existuje ještě jeden receptor - TROY, který svou doménou připomíná doménu XEDAR. Jeho signální dráhy se neúčastní ani EDA-A1 ani EDA-A2 (Bossen et al., 2006), avšak spolu s adaptorovým proteinem TRAF6 hrají roli při morfogenezi zubních hrbolků (Ohazama et al., 2004a). *Eda* signální dráha vede k aktivaci NFκB transkripčních faktorů (Courtney et al., 2004) (obr. 10).



Obrázek 10. Schematické znázornění EDA signalizace. *Eda* je exprimován nejprve v ústním epitelu a poté v buňkách vnějšího sklovinného epitelu, jeho receptor *Edar* v zubním epitelu v buňkách sklovinného uzlu. *Wnt/Lef1* regulují transkripci. Protein ektodysplasin je štěpen protézami a váže se na receptor EDAR. Tím iniciuje EDA signalizaci. Po aktivaci EDA receptoru dojde k navázání adaptorového proteinu EDARADD a přes TRAF6/TAK1/TAB2 komplex dojde k aktivaci NEMO/IKK komplexu. Kinázy inhibitoru κB (IKK) fosforylují inhibitor κB (IκB), tím dojde k degradaci inhibitoru, uvolnění NFκB a jeho přesunu do jádra, kde aktivuje transkripci cílových genů. Mezi popsané patří *Wnt/Dkk*, *Shh*, *Bmp/Sostdc1* a další. EDA signalizace může být zpětně regulována přes *Wnt* dráhu skrze její inhibitor *Dkk*. Hvězdičky značí členy *Eda* signální dráhy, jejichž mutace způsobuje fenotyp podobný EDA fenotypu. (Upraveno podle Cui and Schlessinger, 2006).

Poprvé se exprese *Eda* objevuje v ústním epitelu na ED 10, ještě před prvními morfologickými známkami zubního vývoje. Během iniciace vývoje (ED 11) až do stádia pupenu (ED 12) exprese *Eda* přetrvává v ústním epitelu, avšak chybí v oblasti zubního epitelu, kde se objevuje exprese *Edar* (Laurikkala et al., 2001). Během dalšího zubního

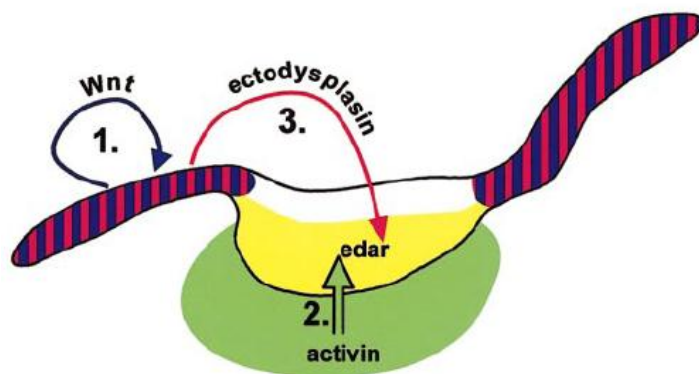
vývoje jsou *Edar* a *Edaradd* exprimovány ve sklovinném uzlu, zatímco *Eda* ve vnějším sklovinném epitelu (Tucker et al., 2000). K signalizaci je tedy nezbytné odštěpení solubilní části EDA ligandu z plasmatické membrány a jeho difuze k receptoru (Elomaa et al., 2001).

I κ K α je exprimován v zubním epitelu a myši s mutací v tomto genu mají poruchu ve vývoji zubních hrbolků (Ohazama et al., 2004b), podobně jako myši Tabby (Grüneberg, 1965)

1.3.2 Regulace *Eda* signální dráhy

Wnt6 indukuje expresi *Eda* v kulturách izolovaných zubních základů. *Lef-1* (transkripční faktor *Wnt* dráhy) deficientní myši mají vady dentice podobné vadám Tabby myši a exprese *Eda* je u nich snížena (Laurikkala et al., 2001) stejně jako v pokročilejších stádiích zubního vývoje u myši se zvýšenou expresí *Dkk1* (inhibitoru *Wnt* dráhy) (Liu et al., 2008). *Eda* gen navíc obsahuje *Lef-1* vazebnou doménu v oblasti 1.6 kb před transkripčním iniciačním místem (Kere et al., 1996), a proto se předpokládá že *Wnt/ β -catenin* signální dráha přímo stimuluje expresi *Eda*.

Eda signální dráha inhibuje aktivitu *Bmp* zvýšením exprese *Bmp* inhibitorů *CCN2* a follistatinu a stimuluje expresi *Shh* (Pummila et al., 2007), která je u Tabby snížena (Pispa 1999). Exprese *Eda* receptoru v zubním epitelu je regulována activinem β A (TGF β rodina) z přiléhajícího mezenchymu (Laurikkala et al., 2001) (obr. 11).



Obrázek 11. Schematické znázornění lokalizace EDA signalizace.

(1) WNT signály ovlivňují expresi *Eda* v ústním ektodermu. (2) Exprese *Edar* v signálním centru v epitelu (žlutě) je regulována activinem β A z mezenchymu (zeleně). (3) EDA navázáním na receptor reguluje funkce signálního centra. (Převzato z Laurikkala et al., 2001).

Zvýšení exprese *Eda-A2* u myši nezpůsobila žádný viditelný fenotyp, avšak zvýšení exprese *Eda-A1* pomocí promotoru K14 mělo za následek tvorbu nadpočetného zubu před prvním

molárem, pozměněnou morfologii molárových korunek (zuby byly kratší a širší, ale počet hrbolků zůstal stejný jako u WT myši) a narušený vývoj skloviny řezáků (řezáky postrádaly diferencované ameloblasty). *Eda-A1* tedy nejspíš hraje roli v kontrole iniciace vývoje ektodermálních derivátů, jejich morfogeneze a diferenciace (Mustonen et al., 2003). Břeží Tabby myši, kterým byl podáván rekombinantní EDA1 protein měly potomky, kterým v 50% chyběla třetí stolička, ale hrbolky se vyvinuly normálně (Gaide and Schneider, 2003).

Pokud overexprese *Eda-A1* dokáže zachránit vyvinutí třetích stoliček u Tabby (Srivastava et al., 2001), ale podávání EDA A1 od ED 11 nikoli, dá se předpokládat, že EDA signalizace je nezbytná pro časný vývoj zubního základu, pro dobu, kdy se ustavuje oblast budoucích molárů (Tucker et al., 2004). Autoři práce, kde byl overexprimován *Eda-A1* u Tabby samců bohužel nebrali v potaz popsáné morfotypy Tabby dentice (viz níže) a je proto možné, že overexprese *Eda-A1* na záchranu třetí stoličky neměla vliv, jelikož náhodně našli pouze jiný morfotyp (MT I), který obsahuje 3 stoličky v čelisti Tabby myši přirozeně.

Myši se zvýšenou expresí genu pro *Eda* receptor (který byl po nasyntetizování konstitutivně funkční i bez přítomnosti ligandu) mají zmnožený počet zubních hrbolků. Objevují se u nich nadpočetné zuby a zároveň může chybět třetí stolička. Proto se zdá, že nadbytek aktivního EDA receptoru může ovlivnit jak počet zubů, tak počet zubních hrbolků (Tucker et al., 2004). Přidáním rozpustného EDA receptoru (na ED 12) ke stoličkám D1 myši (které mají mutaci v genu pro *Eda* receptor) kultivovaným in vitro, nedošlo k uzdravení D1 fenotypu. Namísto toho se snížila exprese *Shh* a *Fgf-4* ve sklovinném uzlu. Vysvětlením je, že rozpustný EDAR vychytá EDA ligand a dochází k napodobení podmínek Tabby mutace (Tucker et al., 2000).

1.3.3 Změny signalizace během vývoje zubu u Tabby

Expres *Fgf-8* (na ED 10,5) a *Bmp-2* (na ED 12) zůstává u Tabby embryí nezměněna. Expresní doména *Fgf-4* v primárním sklovinném uzlu je oproti WT myším menší, stejně jako samotný sklovinný uzel. Na rozdíl od normálních myši, kde jsou na ED 16 patrné dva až tři sklovinné uzle exprimující *Fgf-4*, je v Tabby čelistech stále patrná pouze jedna expresní doména (jeden sekundární sklovinný uzel), odpovídající prvnímu páru zubních hrbolků. Oproti WT myším jsou ostatní molekuly charakteristické pro primární sklovinný uzel (*Bmp-4*, *Shh*, *Wnt10a*) u Tabby embryí ve stádiu pohárku exprimovány v menší míře. *Bmp-4* je navíc intenzivně exprimován v zubním mezenchymu, čímž způsobuje jeho zmenšení. Intenzita

exprese *Fgf-3* a *-10* v mezenchymu dentální papily je slabší než u WT myši (Pispa et al., 1999).

FGF-10 a -4 přidané k zubním základům Tabby kultivovaným in vitro, zvyšují počet zubních hrbolků. Tato záchrana vývoje zubních hrbolků neukazuje na přímou spojitost mezi *Eda* a *Fgf* signálními drahami, ale může být vysvětlena stimulací proliferace epitelových buněk. Předpokládá se totiž, že defekt ve vývoji zubních hrbolků u Tabby je způsoben nedostatečným růstem zubního epitelu (Pispa et al., 1999).

1.3.4 Embryonální vývoj zubů a výsledný fenotyp

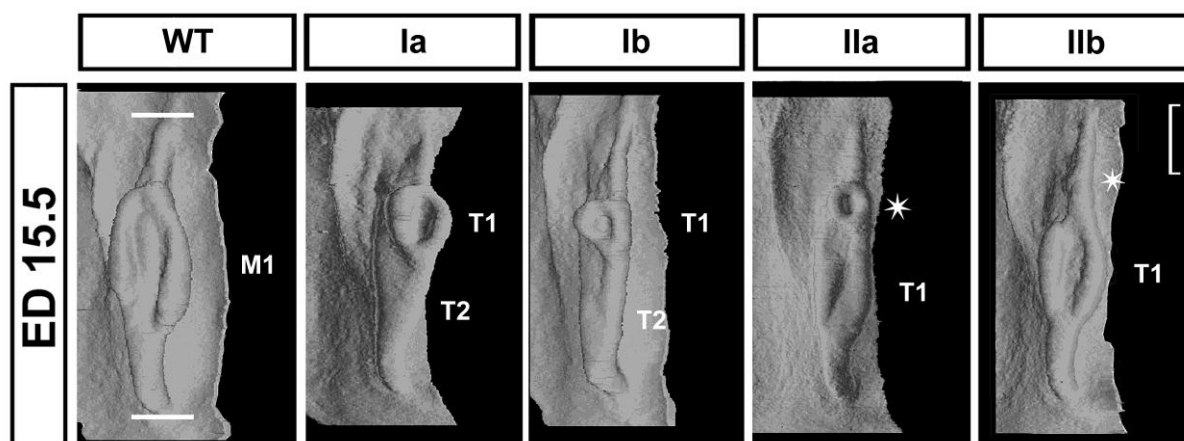
Během embryonálního vývoje zubních základů myši Tabby dochází ke vzniku zubních malformací, které jsou nejvýraznější v dolní čelisti. Zuby dospělých Tabby myši vykazují řadu abnormalit v počtu i tvaru oproti zubům WT myši. Postiženy jsou řezáky i stoličky, horní i dolní čelisti (Cermakova et al., 1998; Grüneberg, 1965; Kristenova et al., 2002; Kristenová-Cermáková et al., 2002).

1.3.4.1 Řezáková oblast

Do ED 13,5 se vývoj řezáku mezi Tabby a WT zárodky morfologicky výrazně neliší. Od tohoto ED se však začíná projevovat vliv Tabby mutace, změnou velikosti (průměru i délky), tvaru a pozice zubního základu. Na pozdních stádiích je Ta řezák kratší a užší, cervical loops zůstávají dlouho symetrické a jsou užší než u WT embryí (Miard et al., 1999). Zajímavé je, že ačkoli je prenatalně postiženo 100% zárodků, poškození funkčních řezáků vykazuje pouze 28% dospělých myši Tabby (Lesot et al., 2004). Postnatálně tedy nejspíš dochází k „uzdravení“ části postižených řezáků a je možné, že *Eda* již není pro postnatální vývoj klíčový. Časný vývoj rudimentárního řezáku ani dynamika *Shh* exprese v řezákové oblasti (Hovorakova et al., 2011) však zatím u Tabby embryí popsány nebyly.

1.3.4.2 Tvářová oblast

První morfologický rozdíl ve vývoji zubního základu mezi WT a Tabby zárodky je pozorovatelný na stádiu pozdního pupene (ED 13). Pupen je u Tabby menší, stejně jako pohárek, který má navíc abnormální tvar. Tabby mají díky absenci proteinu EDA menší sklovinný uzel. Výsledkem je menší zubní korunka a snížený počet zubních hrbolků (Pispa et al., 1999).



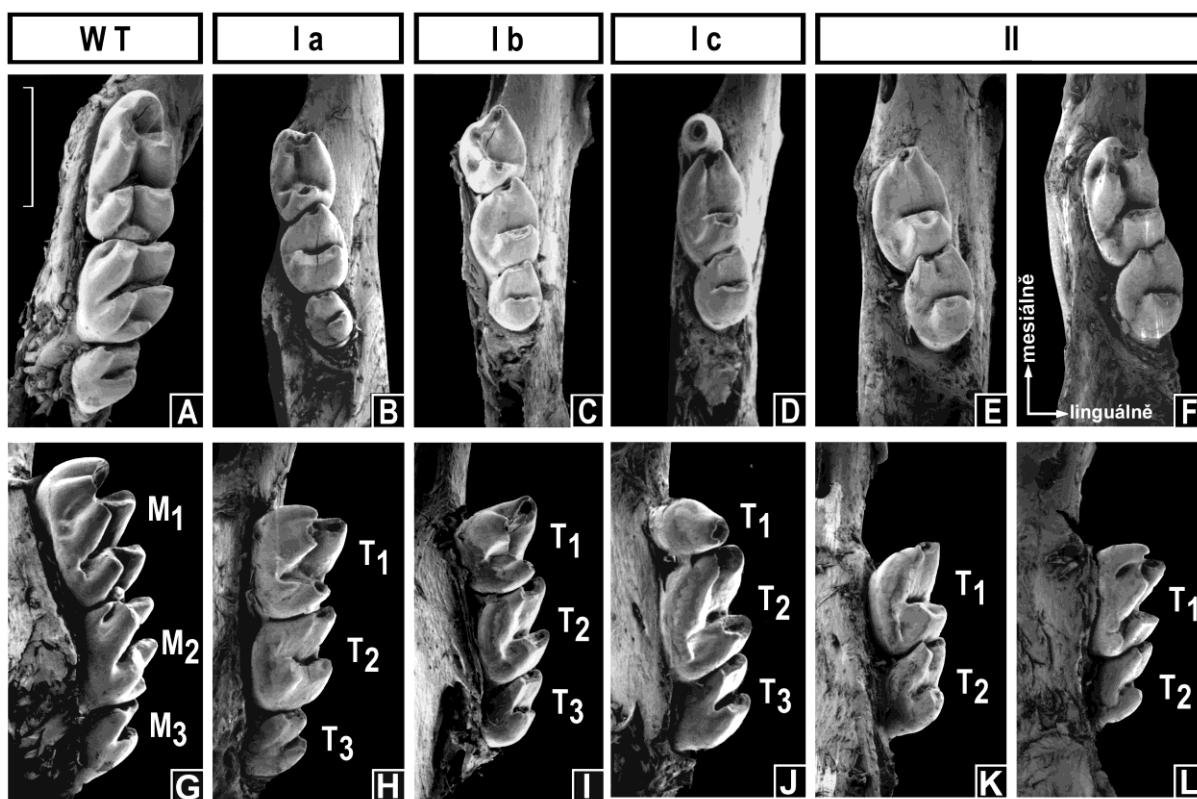
Obrázek 12. 3D rekonstrukce zubního epitelu u WT zárodků a u jednotlivých Tabby morfotypů.

Hmotnost embryí 301 – 350 mg. M1 značí pohárek první stoličky u WT zárodku. T1 a T2 značí základy prvního a druhého tvářového zubu u různých Tabby morfotypů (Ia, Ib, IIa, IIb). Hvězdička značí silně hypoplastický zubní základ, který během prenatalního období zaniká. Měřítka znázorňují 250 μ m. (Přepřacováno podle Peterkova et al., 2002a).

Tabby embrya vykazují zvýšenou apoptózu ve specifických místech zubního epitelu prokázanou od ED 15,5 (Boran et al., 2005). Primární příčinou však není mutace *Eda* genu, zvýšená apoptóza je nejspíš důsledkem poškozeného vývoje dolních stoliček, způsobeného chybou v segmentaci zubního epitelu u Tabby, která byla popsána od ED 15,5 (Boran et al., 2005; Peterkova et al., 2002a) (obr. 12, 14). U Tabby embryí však nebyl nalezen na odpovídajícím stádiu typický rudimentární pupen R2. Jeho absence a dopad na vývoj následujících tvářových zubů však zůstaly nevysvětleny (Peterkova et al., 2002a). Podobně nebyla zmapována ani časoprostorová dynamika *Shh* exprese v signálních centrech rudimentárních zubních primordií a její vztah k prvnímu funkčnímu tvářovému zubu, které jsou známy u WT embryí na časných stádiích odontogeneze (Prochazka et al., 2010).

Výsledkem prenatalního vývoje jsou různě velká poškození funkční tvářové dentice. U dospělých homo/hemizygotních myší Tabby jsou tvářové zuby v dolní čelisti postiženy více nežli v horní čelisti. Dolní tvářové zuby jsou natolik změněny, že není možné rozpoznat morfologické charakteristiky stoliček WT myší. Byly proto označeny T1, T2, T3 (Kristenova et al., 2002) (obr. 12, 13). Jejich počet, velikost a tvar se liší nejen mezi myšmi stejného fenotypu, ale i mezi levým a pravým kvadrantem téhož zvířete. Na základě těchto rozdílů v tvářových oblastech dolní čelisti se u Tabby homozygotů a hemizygotů rozlišují dva morfotypy čelistních kvadrantů. Morfotyp I (dělicí se dále na podtyp Ia, Ib, Ic) zahrnuje kvadranty obsahující tři tvářové zuby, morfotyp II (dělicí se na podtypy IIa, IIb) pouze dva tvářové zuby. Morfotypy I a II se však liší nejen počtem tvářových zubů, ale i tvarem a uspořádáním zubních hrbolků prvních dvou zubů tvářové oblasti (Kristenova et al., 2002)

(obr. 13). Jednotlivé morfotypy lze odlišit již prenatalně od ED 15,5 (Peterkova et al., 2002a) (obr. 12).

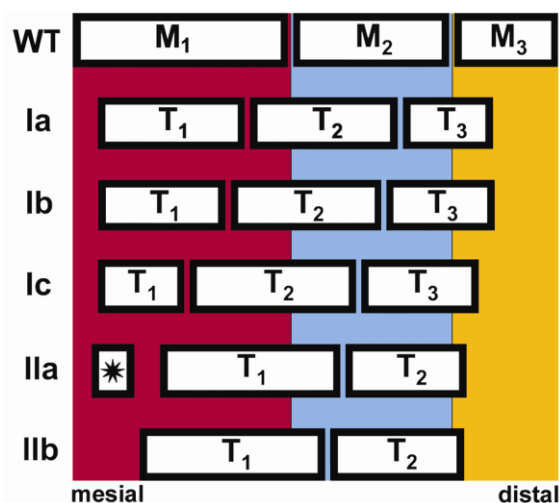


Obrázek 13. Morfotypy funkční Tabby dentice.

M1, M2 a M3 značí první, druhou a třetí stoličku u WT myši (A, B, G, H), T1, T2 a T3 značí první, druhý a třetí tvářový zub u Tabby. Morfotyp I obsahuje v čelisti 3 tvářové zuby (B, C, D, H, I, J), morfotyp II pouze 2 tvářové zuby (E, F, K, L). Měřítko znázorňuje 1200 μ m. (Přepřacováno podle Kristenova et al., 2002).

U Tabby heterozygotů jsou nejčastější 3 stoličky, výjimečně se mohou vyskytovat i 4 nebo 2 stoličky (Kristenová-Cermáková et al., 2002). Pokud je u Tabby v jednom kvadrantu první stolička menší než druhá, je považována za nadpočetný zub (S) (Sofaer, 1969). Nadpočetný zub jde však s jistotou určit jen u Tabby heterozygotů, protože je u nich možné identifikovat M1.

Porucha předozadní segmentace Tabby dentice má za následek, že stoličky M1, M2, M3 u WT myši neodpovídají ani pozičně primordiím tvářových zubů T1, T2, T3 u Tabby homo/hemizygotů. Vysvětlením může být předpoklad, že T1 vzniká ze stejné hmoty jako zadní část M1 a přední část M2 a tato porucha se promítá i na další tvářové zuby (Peterkova et al., 2002a) (obr. 14).



Obrázek 14. Schematické znázornění uspořádání zubů v tvářové oblasti dolní čelisti WT a Tabby myši.

Obdélníky znázorňují první (M₁), druhou (M₂) a třetí (M₃) stoličku WT myši nebo první (T₁), druhý (T₂), a třetí (T₃) tvářový zub u různých morfotypů (Ia, Ib, Ic, IIa, IIb) myši Tabby. Předpokládá se, že existuje vývojová spojitost mezi zubními základy Tabby dentice a oblastmi zubního epitelu, které dávají u WT zárodků vznik M₁ (červená), M₂ (modrá) a M₃ (žlutá). Změny v předozadní segmentaci odontogenních tkání u Tabby zárodků mohou mít za následek vznik Tabby zubu z dvou přilehlých částí WT zubů. (Převzato z Peterkova et al., 2002a).

2 Cíle diplomové práce

Vývoj rudimentárních zubních základů během odontogeneze u myši Tabby zůstává zatím neobjasněn. Jelikož je myší dentice dolní čelisti rozdělena na dvě odlišné části (řezákovou a tvářovou), jsou také cíle diplomové práce rozděleny do dvou částí:

1. V řezákové oblasti je cílem této diplomové práce potvrdit hypotézu, že *Shh* exprese na časných vývojových stádiích (ED 12,5 – 13,5) nepatří základu funkčního řezáku, nýbrž rudimentárnímu zubnímu základu stejně, jak bylo prokázáno na myších kmene CD1. Dalším cílem je potvrdit hypotézu, že stejně jako první morfologické změny, se první změny v expresi *Shh* v primordiu funkčního řezáku Tabby embryí objevují kolem ED 13,5.
2. V tvářové oblasti Tabby embryí chybí morfologická struktura pupenu rudimentu R2. Dalším cílem této diplomové práce tedy je potvrdit hypotézu, že u Tabby zárodků chybí také *Shh* exprese v místě, kde se normálně vyvíjí rudiment R2 v dolní čelisti u WT myši.

3 Materiál a metody

3.1 Chov *Eda* deficientních myší

Pro tuto práci byla použita embrya *Eda* deficientních myší, označovaných Tabby (Ta) a myší kontrolních (WT), odebíraná v intervalech od ED 12.5 do ED 15.5. Chovné páry (inbrední linie B6CBACa-A^{W-J}/A-EDA^{Ta}/0) byly zakoupeny z Jacksonovy laboratoře, Bar Harbor, Maine, USA. Mutace genu *Eda* je lokalizována na X chromozomu. To znamená, že mutantní samci budou vždy hemizygotní. Tabby samice mohou být buď homozygotní (mutace je na obou X chromozomech), heterozygotní (mutace se vyskytuje na jednom X chromozomu, zatímco druhý je zdravý) nebo hemizygotní. Hemizygotním samicím zdravý X chromozom chybí nebo je inaktivovaný. Funkční je tedy pouze jeden X chromozom, který je v daném úseku mutovaný.

		Samice						
		heterozygotní		homozygotní		hemizygotní		
		Ta/+		Ta/Ta		Ta/0		
		Ta	+	Ta	Ta	Ta	0	
Samec hemizygotní Ta/0	Ta	Ta/Ta	Ta/+	Ta/Ta	Ta/Ta	Ta/Ta	Ta/0	♀
	0	Ta/0	0/+	Ta/0	Ta/0	Ta/0	0/0	♂

Tabulka 1. Schéma křížení myší Tabby. Modrá políčka označují homo/hemizygotní potomky, fenotypově rozpoznatelné podle řídké zrzavé srsti s lysinami za ušima. Zelená políčka označují heterozygotní samice charakteristické mourovatou srstí. Šedivé políčko značí vadu neslučitelnou se životem. Růžové políčko označuje zdravého potomka (WT). + označuje nepostíženou alelu genu *Ta/Eda*, Ta označuje alelu mutovanou. (Upraveno podle Kristenová-Cermáková et al., 2002).

Vývoj zubů jsme studovali u homo/hemizygotních embryí, která byla postižena syndromem XLHED. Embrya pocházela z křížení homozygotních nebo hemizygotních samic s hemizygotními samci. Taková embrya jsou vždy homo- nebo hemizygotní (tab. 1). Pro srovnání byla použita embrya myší kontrolních, které pocházejí ze stejného chovu, ale jejich fenotyp i genotyp odpovídá „wild type“ (WT) myším. Výhodou kontrolních myší ze stejného

chovu je, že mají totožné genetické pozadí jako myši postižené. Tím odstraníme riziko případných rozdílů mezi Tabby a WT myšmi jiných kmenů, které by mohly být způsobené mezi-kmenovou variabilitou na základě odlišného genetického pozadí. Kontrolní myši (WT) jsme získali křížením kontrolního samce (+/0) a kontrolní samice (+/+).

Bylo zpracováno 93 embryí mutantních myší spolu s 57 embryi myší kontrolních. Pro porovnání distribuce hmotnosti zárodků na jednotlivých embryonálních dnech bylo použito 141 mutantních myší, 109 WT myší a 238 laboratorních myší kmene CD1.

3.2 Chov transgenních myší

Pro vizualizaci exprese *Shh* během embryonálního vývoje jsme použili cre/lox systém s vizualizací pomocí detekce galaktosidázové aktivity barvením substrátu X-gal.

Studovali jsme opět Tabby homozygotní a hemizygotní embrya, která vznikla křížením kmene Tabby-Shh(EGFP/cre) samců a Tabby-Rosa26LacZ samic. Samci byli vždy hemizygotní pro *Ta* (-/0) a heterozygotní pro reportérový gen (+/-), samice byly homozygotní pro *Ta* (-/- neboli *Ta/Ta*) i reportérový gen (+/+).

3.2.1 Tabby-Shh(EGFP-cre)

Kmen Tabby-Shh(EGFP/cre) vznikl křížením kmene Tabby s kmenem B6.129S Shhtml(EGFP/cre)Cjt/J, zakoupeným v Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA), exprimujícím fúzní produkt z endogenního *Shh* lokusu složený z *EGFP* (Endogenous Green Fluorescent Protein) a *cre* rekombinázy. Proto všechny buňky těchto embryí exprimující *Shh* exprimují také zelený fluorescenční protein *GFP* a *cre* rekombinázu.

Transgenní myši byly genotypovány podle genotypovacího protokolu Jacksonovy laboratoře (http://jaxmice.jax.org/protocolsdb/f?p=116:2:415766601963729::NO:2:P2_MASTER_PROTOCOL_ID,P2_JRS_CODE:4619,005622).

3.2.2 Tabby-Rosa26LacZ

Kmen Tabby-Rosa26LacZ vznikl křížením Tabby myší s reportérovým kmenem Rosa26LacZ (B6.129S4-Gt(ROSA)26Sortm1Sor/J), zakoupeným v Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA). Tento reportérový kmen obsahuje STOP sekvenci (neomycinovou expresní kazetu) ohraničenou dvěma loxP místy, gen pro *lacZ* vložený do *Gt(ROSA)26Sor* lokusu a

polyadenylační sekvenci. Přítomnost neomycinové expresní kazety brání expresi genu *lacZ*. Pokud dojde ke zkřížení s transgenním kmenem nesoucí gen pro *cre* rekombinázu, dojde k vyštěpení STOP sekvence a *lacZ* se exprimuje ve všech buňkách exprimujících zároveň *cre* rekombinázu.

Transgenní myši byly genotypovány podle genotypovacího protokolu Jackson Laboratory (http://jaxmice.jax.org/protocolsdb/f?p=116:2:3863388605329110::NO:2:P2_MASTER_PROTOCOL_ID,P2_JRS_CODE:4615,003474).

3.3 Získávání embryí a určení stáří zárodku

Myši byly připouštěny přes noc a ráno byly u samic odečteny vaginální zátky. Poledne téhož dne bylo určeno jako embryonální den (ED) 0,5. Embrya byla odebírána na stádiích ED 12,5, 13,5, 14,5, 15,0, 15,5. Samice byly usmrceny cervikální dislokací. Poté byla samici vyňata děloha a na petriho misce byla z dělohy postupně odebírána embrya.

Během prenatalního vývoje zubů probíhají vývojové změny velice rychle a během jednoho embryonálního dne dochází k obrovskému množství těchto změn. Jelikož může být vývoj embrya ovlivněn epigenetickými faktory, velmi často se stává, že i v rámci jednoho vrhu získáme embrya na odlišném stádiu vývoje (biologický věk), ačkoli embryonální den (chronologický věk) je stejný. Tělesná hmotnost myších zárodků určitého stáří je tedy značně variabilní ale velice dobře koreluje se stádiem vývoje zubů (obr. 15).

Pokud bychom porovnávali například nejtěžší (a tedy vývojově nejpokročilejší) zárodek WT s nejlehčím (vývojově méně pokročilým) zárodkem mutovaným, které mají stejné chronologické stáří, najdeme odlišný tvar sledované struktury. Tato odlišnost však odráží pouze nižší vývojový stupeň, a neměla by být posuzována jako anomálie vzniklá mutací. Proto jsme pro upřesnění chronologického stáří zárodků a určení stádia zubního vývoje používali jejich tělesnou hmotnost (Peterka et al., 2002). Hmotnost musela být stanovena ihned po vynětí zárodků z děložní dutiny a odstranění embryonálních obalů, jelikož embrya na vzduchu rychle ztrácí vodu a krev a jejich hmotnost se snižuje.

Tabulka 2. Protokol WISH:

	vždy 500µl/vzorek	čas	teplota	poznámky
DEN 1	prosvětlení tkání a hybridizace	Methanol 75%	5 min	4°C
		Methanol 50%	5 min	4°C
		Methanol 25%	5 min	4°C
		PBS	2x 5 min	4°C
		6% peroxid vodíku	1 hod	4°C
		PBS	3x 5 min	4°C
		Proteináza K	5-7 min	20°C
		Stop roztok	5 min	20°C
		PBS	5 min	20°C
		4%PFA, 0,2%glutaraldehyd	1 hod	20°C
		PBS	5 min	20°C
		HYB:PBS	10 min	20°C
		HYB	10 min	20°C
		HYB	2 hod	70°C
		HYB+ <i>Shh</i> sonda	přes noc	70°C
DEN 2	vazba anti-DIG protilátek			1:2000 v PBS
				Glycin 2mg/ml v PBS
				1 : 1
				1,5µl/vzorek předehřátý roztok
		HYB	5 min	70°C
		SOL I	5 min	70°C
		SOL I	2x 30 min	70°C
		SOL I	30 min	65°C
		SOL II	2x 30 min	65°C
		SOL II	30 min	20°C
DEN 3	vyvolání signálu	MAB	3x 5 min	20°C
		Blokovací roztok	1,5 hod	20°C
		Protilátka	přes noc	4°C
DEN 4	vyvolání signálu	MAB+levamisol	3x 5 min	4°C
		MAB+levamisol	3x 1 hod	4°C
		TRIS HCl+levamisol	přes noc	4°C
DEN 4	vyvolání signálu			100 : 1
		TRIS HCl+levamisol	2x 10 min	4°C
		BM purple AP (Roche)	přes noc a déle	4°C
				300µl/vzorek dokud se neobjeví pozitivní signál

Vzorky byly po vyvolání signálu fixovány ve směsi 4% PFA s 0,2% glutaraldehydem 1h při pokojové teplotě.

Příprava protilátky (na 8 vzorků)

- 3 mg homogenizované embryonální tkáň + 500 µl MAB zahřát 30 min na 70°C
- zchladit na ledu
- přidat 1,6 µl anti DIG protilátky (Rosche), preadsorbce minimálně 1h při 4°C

- centrifugovat na 13tis otáček 10 min při 4°C
- spojit s 3,5 µl blokovacího roztoku

Hybridizační roztoky

Tabulka 3. Složení hybridizačních roztoků:

Chemikálie	HYB	SOL I	SOL II
Formamide	25ml	25ml	25ml
SSC 20x	12,5ml	12,5ml	5ml
Kys. Citrónová 1M	3ml	3ml	1,2ml
SDS 20%	250µl	2,5ml	500µl
Tween 20%	200µl	-	200µl
Kvasinková tRNA	50µl	-	-
injekční voda	Doplnit do 50ml		

SSC pufr

17,5 g NaCl, 8,8 g citronanu sodného, 100 ml injekční vody a upravit pH na 7,0

PBS

8g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na₂HPO₄, 0,24 g KH₂PO₄, 1 l injekční vody a upravit pH na 7,4

MAB (Pufr kyseliny jablečné)

5,8 mg kys. jablečné, 17 ml NaCl 5M, 3 g NaOH, 2 ml Tween 20%, 50 ml destilované vody a upravit pH na 7,5

Blokovací roztok

45 ml MAB, 5 ml 10% ovčího séra, 500 µl levamisolu 100x

Levamisol 100x

0,5 g tetramisole hydrochloride rozpustit v 10 ml destilované vody

Použitá cRNA sonda značená digoxigeninem byla transkribována in vitro transkripčním kitem (Roche) z cDNA fragmentu *Shh* genu zaklonovaného do vektoru pBluescript II SK (+/-), který nám daroval Dr. McMahon, Harvardská univerzita, Cambridge, USA. Jako pozitivní kontrola sloužily jazykové papily a folikuly vyvíjejících se chlupů (vousů).

Zafixované vzorky čelistí byly nafoceny pomocí sterolupy (Leica MZ6) s digitální kamerou (Leica DC480) (Wetzlar, Německo) a uloženy do roztoku PBS (pH 7,4).

3.5 Detekce galaktosidázové aktivity (barvení pomocí X-Gal)

X-gal (5-bromo-4-chloro-indolyl- β -D-galactopyranosid) je organická sloučenina složená z galaktózy a indolu. Jelikož jde o analog laktózy, může být X-gal hydrolyticky štěpen β -galaktosidázou (kódovanou genem *LacZ*) za vzniku galaktózy a 5-bromo-4-chloro-3-hydroxyindolu, který dimerizuje a je oxidován na modré nerozpustné 5,5'-dibromo-4,4'-dichloro-indigo.

Inkubací v barvicím roztoku obsahujícím X-Gal tak měla embrya (vzniklá křížením Tabby-Shh(EGFP/cre) samců a Tabby-Rosa26LacZ samic) modře zabarveny všechny buňky a jejich potomky, které v průběhu embryonálního vývoje exprimovaly *Shh*.

Oddělené hlavičky předem zvážených embryí byly promyty v sodném fosfátovém pufru, fixovány max. 20 min v 4%PFA, opět promyty v sodném fosfátovém pufru a inkubovány v barvicím roztoku přes noc při 37°C. Po vyvolání signálu byly vzorky promyty v PBS (pH 7,4) a uchovány ve 4%PFA. Z hlaviček byly vypreparovány čelisti, které byly nafoceny pomocí sterolupy (Leica MZ6) s digitální kamerou (Leica DC480) (Wetzlar, Německo) a uloženy na týden do roztoku Bouinu (Penta).

Sodný fosfátový pufr

115 ml roztoku A+ 385 ml roztoku B, pH 7,5

A: 6 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ v 500 ml destilované vody

B: 13,4 g Na_2HPO_4 v 500 ml destilované vody

Barvicí roztok

100 ml sodného fosfátového pufru, 62,5 mg KCl, 20,3 mg $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 126,0 mg

$\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 98,7 mg $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$

Těsně před použitím přidáme na 10 ml barvicího roztoku 240 μl X-gal (50 mg/ml DMF).

3.6 Histologické techniky

3.6.1 Zhotovení zmrazených řezů

Čelisti byly prosyceny sacharózou vkládáním do roztoků sacharózy (Sigma) v PBS (pH 7,4) o zvyšující se koncentraci (1% - 20%) a ponechány přes noc ve zmrazovacím roztoku (Tissue Tek O.C.T a 20% sacharóza v poměru 1:1). Poté byly se zmrazovacím roztokem vloženy do

formiček. Formička se vzorkem byla ponořena na 2 minuty do 2-methylbutanu (Sigma), vychlazeného na -60°C na suchém ledu. Pomocí fixu byla označena orientace vzorku.

Zamrazené vzorky byly uchovávány při teplotě -70°C a den před krájením se přesunutím do jiného mrazicího boxu zahřály na -20°C. Sériové frontální řezy o tloušťce 10 µm byly zhotoveny na kryotomu (Microm HM 560), při teplotě nože -14°C a teplotě vzorku -12°C, byly sbírány na skla Superfrost a uchovávány ve vlhké komůrce ve 4°C.

3.6.2 Zhotovení parafinových řezů

Vypreparované čelisti byly fixovány v činidle Bouin (Penta) minimálně 7 dní, poté vzestupnou alkoholovou řadou odvodněny a převedeny přes toluen do parafinu (tab. 4).

Tabulka 4. Převedení vzorků do parafinu.

Chemikálie	čas
80% EtOH	24 hod
96% EtOH	1 hod
96% EtOH	1 hod
96% EtOH	přes noc
100% EtOH	30 min
100% EtOH	30 min
100% EtOH	1 hod
Toluen 1	10 min
Toluen 2	10 min
Parafín 1A	1 hod
Parafín	1 hod
Parafín	1,5 hod
Parafín	1,5 hod
Rakev	přes noc

Po vyjmutí z termostatu byl vzorek ještě před vychladnutím parafinu orientován. Po vychladnutí parafinu byl vytvořen parafinový bloček. Naorientovaná čelist v parafinovém bločku byla nakrájena na rotačním mikrotomu (Leitz). Tloušťka řezů byla 10 µm. Řezy byly lepeny na skla tenče potřená směsí vaječného bílku a glycerinu (1:1).

3.6.3 Barvení histologických řezů jádrovou červení

Z parafinových řezů přilepených na podložní skla byl odstraněn parafín pomocí xylenu (2x 10min) a provedena hydratace řezů sestupnou alkoholovou řadou (100% EtOH 3x 5min, 96%EtOH 2x 2min, destilovaná voda 2x 3min). Řezy zmrazených vzorků byly pouze

fixovány 10 min v 10% formaldehydu. Jádra buněk na řezech byla nabarvena jádrovou červení (5-15s), přebytečná barva byla vymyta v destilované vodě (3x 2min) a řezy odvodněny vzestupnou alkoholovou řadou (2x 96% ethanol, 2x 100% etanol, každá inkubace 2 minuty). Poté byly řezy projasněny v xylenu (2x 5min) a překryty krycím sklem přilepeným pryskyřicí Neomount (Merck).

Roztok jádrové červení

0,5g jádrové červení (Sigma) bylo za tepla rozpuštěno ve 100 ml 5% roztoku síranu hlinitého v destilované vodě. Poté byl roztok zfiltrován a uložen to temna.

3.7 3D rekonstrukce

Pod mikroskopem značky Jenaval nebo Leica DMLB vybaveným kreslicím zařízením byla překreslena bazální lamina oddělující dentální a orální epitel od mezenchymu dásně a z druhé strany bylo překresleno rozhraní orálního epitelu a dutiny ústní, zároveň byla překreslena lokalizace *Shh* exprese. Na tyto nákresy bylo použito zvětšení 310x-500x. Nákresy jednotlivých řezů byly na světelném panelu superponovány best fit metodou. Jedná se o navrstvení nákresů na sebe podle jejich nejlepší tvarové shody.

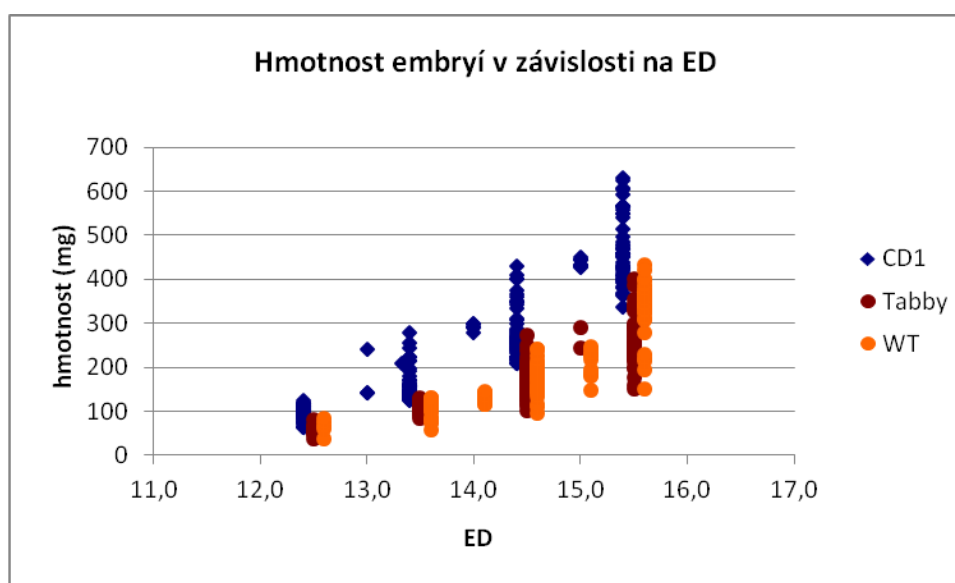
Vlastní memorizace nákresů a zhotovování 3D modelů a jejich obrázků jsme prováděli na pracovišti ve Štrasburku (Francie). Kontury nákresů byly snímány (memorizovány) digitální kamerou Hamamatsu C2400 spojenou se zobrazovacím systémem (Lesot et al., 1996). Jejich další zpracování probíhalo pomocí softwaru VG Studio Max 2.0 Sun (VG Studio Max, Heidelberg, Německo). Počítačově vytvořený 3D model nám vytvořil představu o skutečném tvaru sledované struktury. Sledování je možné ze všech úhlů pohledu.

Výsledné 3D rekonstrukce pak byly analyzovány a vyhodnoceny pomocí zpětné korelace s původními histologickými řezy. Kombinací těchto dvou metod jsme získali představu o prostorovém uspořádání zubního epitelu, umístění exprese *Shh* a o jejich změnách v jednotlivých stádiích vývoje.

4 Výsledky

Abychom zjistili, zda bude možné korelovat naše data s literaturou, kde se většinou ke studiu normálního vývoje zubu používají laboratorní myši kmene CD1, porovnali jsme hmotnosti Tabby, WT a CD1 embryí na jednotlivých embryonálních dnech (ED). Je totiž známo, že hmotnost embryí koreluje prenatalně velmi dobře se stádiem zubního vývoje (Peterka et al., 2002) (obr. 15).

Embrya kmene Tabby a WT se stejným genetickým pozadím byly hmotnostně a tedy i vývojově téměř o den opožděny oproti embryím kmene CD1. Přesto se našel překryv hmotností, kdy byly na jednom ED nejvíce pokročilé zárodky Tabby a WT stejně těžké jako nejméně pokročilé zárodky CD1 (graf 1). Analýzy jsme dále prováděli paralelně u embryí Tabby a WT embryí derivovaných z Tabby kmene.

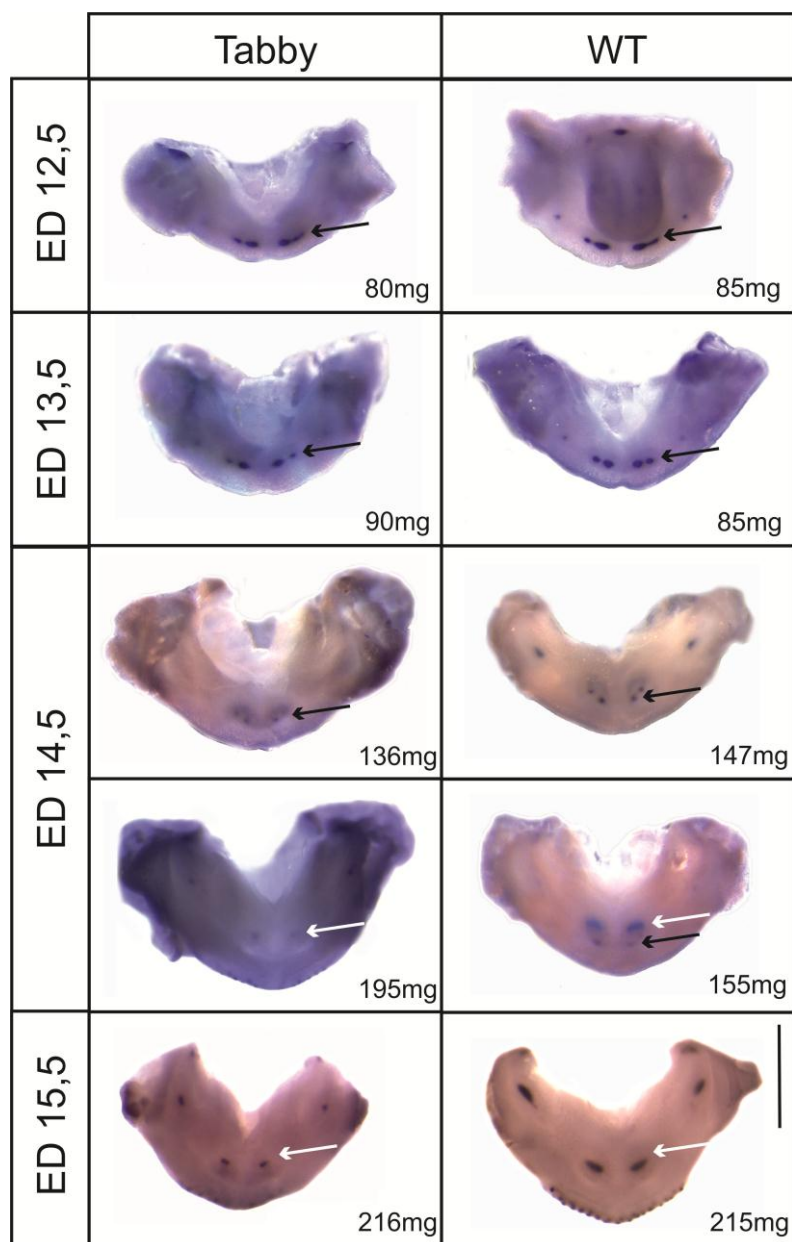


Graf 1. Porovnání hmotností embryí na jednotlivých embryonálních dnech. Tabby (červeně) i WT embrya (oranžově) jsou vývojově téměř o den opožděna oproti klasickým laboratorním myším CD1 (modře).

4.1 Řezáková oblast

K vytvoření představy o časném vývoji zubních základů v řezákové oblasti u Tabby myší, jsme provedli analýzu *Shh* exprese v zubním epitelu pomocí whole mount in situ hybridizace (WISH) dolních čelistí Tabby a WT zárodků odebraných na ED 12,5 – 15,5.

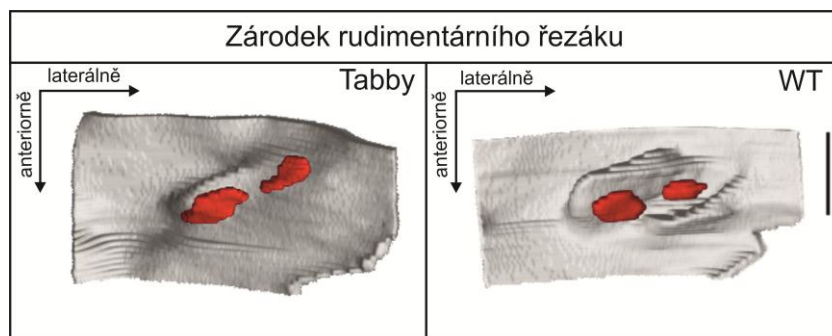
U Tabby i WT zárodků jsme v každém kvadrantu dolní čelisti našli dvě postupně se objevující *Shh* expresní domény. První oblast exprimující *Shh*, lokalizovaná více anteriorně (vpředu), se objevila na ED 12,5 a přetrvávala až do ED 14,5. Z počátku měla podlouhlý tvar a v průběhu vývoje se rozpadla do dvou bodových domén. Nepozorovali jsme žádné rozdíly mezi Tabby a WT zárodky. Druhá oblast s *Shh* expresí se objevila u vývojově pokročilejších zárodků (136 mg a více) na ED 14,5. Oproti první oblasti byla lokalizována více posteriorně (vzadu). Ačkoli jsme tuto posteriorní *Shh* expresní doménu našli v řezákové oblasti WT i Tabby zárodků, u Tabby byla výrazně menší, co do intenzity i plochy (obr. 16).



Obrázek 16. Expresse *Shh* v dolní čelisti embryí Tabby a WT myši. Černá šipka ukazuje první, anteriorní oblast *Shh* exprese, bílá šipka druhou, posteriorní. Signál lokalizovaný v zadní části čelistních oblouků patří vyvíjejícím se tvářovým zubům. Měřítko znázorňuje 1 mm.

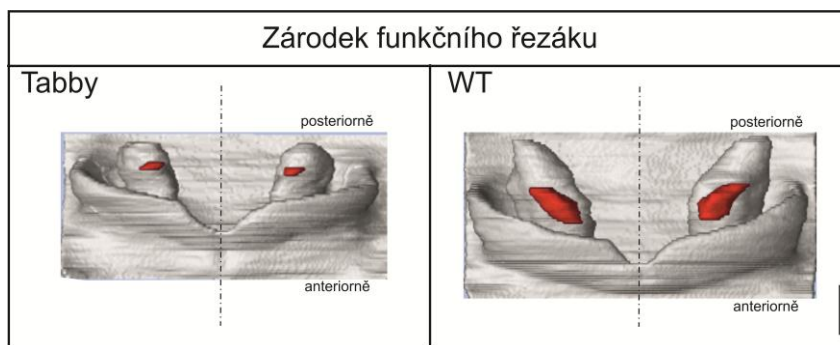
Pro přesnější posouzení prostorového uspořádání nalezených *Shh* exprimujících oblastí jsme vzorky nakrájeli na frontální řezy a vytvořili 3D rekonstrukce epitelu řezákové oblasti.

Zjistili jsme, že dříve se objevující anteriorní *Shh* doména byla vzhledem k nízkému vývojovému stádiu řezákového epitelu lokalizována pouze povrchově. Nacházela se na okraji vyvíjejícího se základu funkčního řezáku. Opět jsme nenalezli viditelné rozdíly mezi WT a Tabby zárodky (obr. 17).



Obrázek 17. 3D rekonstrukce řezákové oblasti dolní čelisti na ED 13,5. Pohled z mezenchymu. *Shh* exprese je značena červeně a je lokalizována na okraji základu funkčního řezáku. Expres se mezi Tabby (80 mg) a WT zárodkem (85 mg) neliší. Měřítka znázorňuje 100 μ m.

Druhá, posteriorní doména byla uložena hlouběji, uprostřed epitelu vyvíjejícího se funkčního řezáku. 3D rekonstrukce potvrdila, že u Tabby je *Shh* exprese lokalizována do stejného místa jako u WT zárodků, avšak zaujímá menší plochu. Vyvíjející se Tabby řezák byl oproti WT výrazně menší (obr. 18).

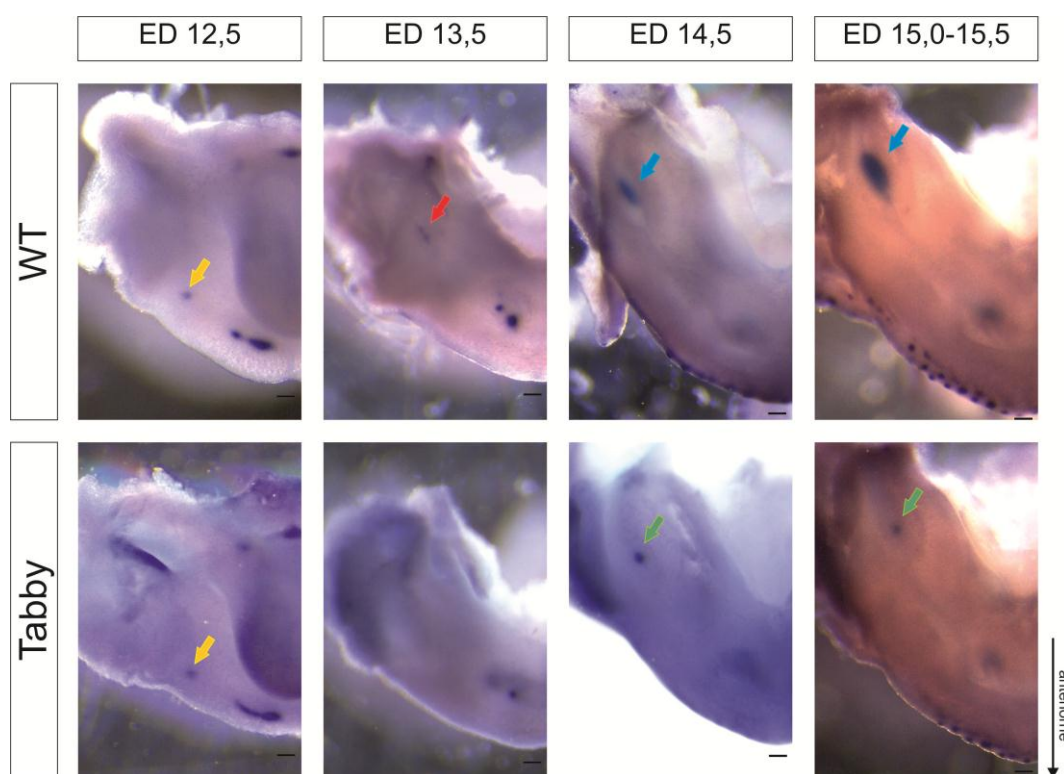


Obrázek 18. 3D rekonstrukce řezákové oblasti dolní čelisti na ED 14,5 – 15,5. Pohled z mezenchymu. *Shh* exprese je značena červeně a je lokalizována uprostřed základu funkčního řezáku. Základ funkčního řezáku i *Shh* expresní doména je u Tabby (195 mg) výrazně menší ve srovnání s WT embryem (216 mg). Měřítka znázorňuje 100 μ m.

4.2 Tvářová oblast

Pro posouzení, jaký má Tabby mutace vliv na průběh vývoje zubů v tvářové oblasti dolní čelisti, jsme vizualizovali *Shh* expresi pomocí whole mount in situ hybridizace (WISH) od ED 12,5 do ED 15,5 (obr. 19). Chronologický věk embryí jsme zpřesnili určením jejich hmotnosti, která v kombinaci s embryonálním dnem detailně vypovídá o vývojovém stádiu zubu (obr. 15).

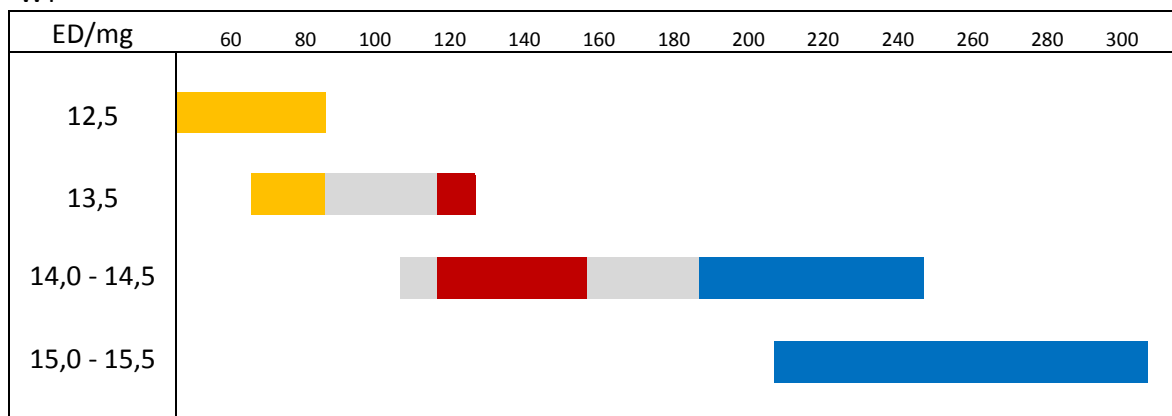
Všechny zkoumané vzorky jsme seřadili podle chronologického stáří zpřesněného definováním hmotnosti zárodku a analyzovali jsme změnu *Shh* exprese v čase.



Obrázek 19. Expres *Shh* v dolní čelisti embryí WT a Tabby myši. Na ED 12,5 se exprese *Shh* v tvářové oblasti u Tabby (65 mg) a WT (85 mg) neliší. Na ED 13,5 je *Shh* exprese patrná pouze u WT zárodku (127 mg), u Tabby (130 mg) exprese na tomto embryonálním dni patrná není. Od ED 14,5 se v tvářové oblasti objevuje *Shh* exprese u WT (216 mg, 240 mg) i Tabby (205 mg, 255 mg), avšak u Tabby je expresní doména viditelně menší. Barevné šipky značí *Shh* expresi v tvářové oblasti. Měřítko ukazuje 100 μ m.

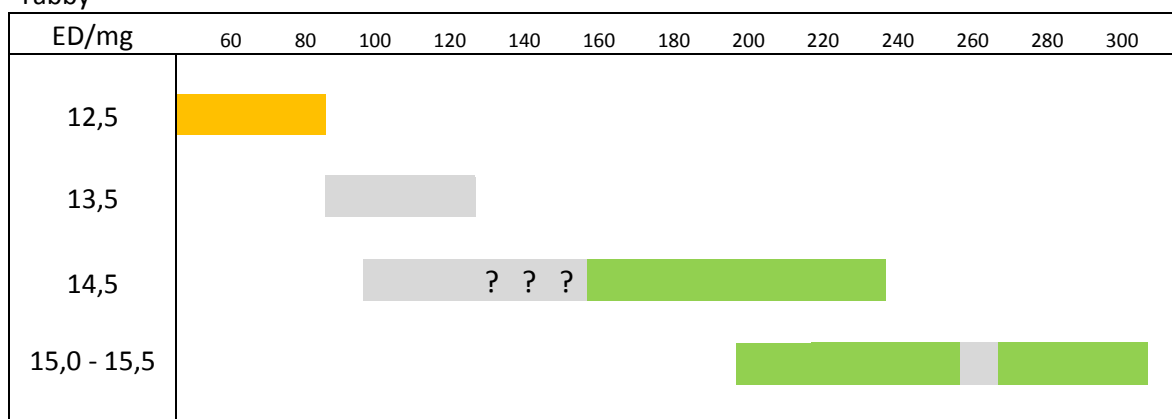
V tvářové oblasti dolní čelisti se u WT embryí během sledovaných vývojových stádií objevily postupně tři signální domény, které odpovídají doménám identifikovaným u CD1 myši (Prochazka et al., 2010).

WT



Graf 2. Expresse *Shh* v tvářové oblasti dolní čelisti u WT zárodků na jednotlivých embryonálních dnech v závislosti na hmotnosti. Žlutá barva znázorňuje *Shh* expresi v místě vyvíjejícího se MS, červená označuje R2 a modrá M1, šedá označuje vzorky bez detekované *Shh* exprese.

Tabby



Graf 3. Expresse *Shh* v tvářové oblasti dolní čelisti Tabby zárodků na jednotlivých embryonálních dnech v závislosti na hmotnosti. Žlutá barva znázorňuje *Shh* expresi v místě vyvíjejícího se MS (shodná u Ta a WT embryí), zelená zubní základ, jehož původ zatím nebyl určen, šedá označuje vzorky bez detekované *Shh* exprese. Otazníky značí nejednoznačný signál.

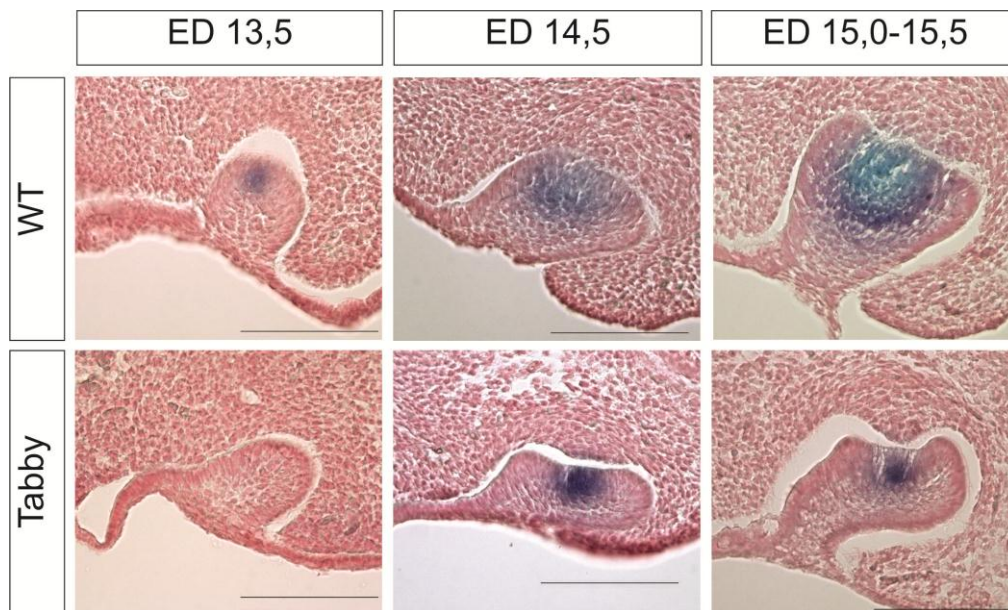
U WT zárodků jsme na ED 12,5 a hmotnostech 59 – 85 mg detekovali první signální doménu, která přetrvávala i na nejlehčích (75 – 85 mg) a tudíž nejméně vývojově pokročilých zárodcích na ED 13,5. Vzorky o hmotnostech 99 – 123 mg a stáří 13,5 neměly v tvářové oblasti známky *Shh* exprese (1. negativní perioda), avšak u nejtěžších vzorků (od 127 mg) se objevila druhá expresní doména *Shh*. Stádium, pro které byla tato druhá doména díky opoždění ve vývoji oproti CD1 myším charakteristická je však den 14,5 s hmotností 128 – 163 mg. Vzorky stáří 14,5 s hmotností 169 – 184 mg opět nevykazovaly známky *Shh* exprese v tvářové oblasti (2. negativní perioda). Teprve na čelistech těžších embryí (190 – 242 mg) se objevila třetí signální doména, která byla viditelná i u všech zárodků na ED 15,0 a 15,5 (215 – 336 mg) (graf 2).

U Tabby embryí jsme v rozmezí ED 12,5 – 15,5 identifikovali v tvářové oblasti dolní čelisti pouze dvě *Shh* signální domény. Na ED 12,5 a hmotnostech 53 – 80 mg jsme detekovali první signální doménu, která vzhledem a časoprostorově odpovídala doméně u WT. Čelisti embryí odebraných na ED 13,5 (85 – 130 mg) nevykazovaly žádnou *Shh* expresi v tvářové oblasti, stejně tak jako lehčí vzorky stáří 14,5 (100 – 155 mg). Od hmotnosti 131 mg se však na některých vzorcích objevilo velmi slabé zbarvení, které se nedalo označit za jednoznačnou *Shh* expresi, avšak zároveň ani za místo bez signálu. Od hmotnosti 162 mg se začal objevovat slabý, ale jasný signál *Shh*, který s přibývajícím hmotností zesiloval a byl detekovatelný na téměř všech vzorcích stáří 15,0 a 15,5 (výjimku tvořilo několik Tabby zárodků okolo hmotnosti 260 mg) (graf 3).

Zatímco u WT byly zřetelné tři období *Shh* exprese oddělené dvěma negativními periodami, u Tabby jsme detekovaly pouze dvě období *Shh* exprese, oddělené jednou negativní periodou. Prostřední pozitivní perioda u Tabby chyběla.

Abychom přesněji definovali, která oblast zubního epitelu exprimuje *Shh*, analyzovali jsme tvar epitelu na frontálních řezech a poté ho spolu s *Shh* signální doménou vizualizovali pomocí 3D rekonstrukcí. Získali jsme tak představu nejen o časové dynamice *Shh* exprese, ale také o uspořádání zubního epitelu a *Shh* exprese v prostoru.

Na zmrazených řezech z hybridizovaných vzorků dolní čelisti barvených jádrou červení se potvrdilo, že *Shh* je na ED 12,5 – 15,5 exprimován pouze v zubním epitelu a nikoli v přiléhajícím mezenchymu. Na ED 13,5 byla exprese u WT embryí viditelná na vrcholu pupenu zubního základu. U Tabby žádná *Shh* expresní doména na tomto stádiu patrná nebyla. Zubní epitel měl u WT i Tabby zárodků podobnou velikost. U starších zárodků od ED 14,5 již byla detekovatelná *Shh* signalizace v zubním epitelu u WT i Tabby. U WT tvar epitelu morfologicky odpovídal počátečnímu stádiu vývoje první stoličky. *Shh* exprese svou plochou zasahovala do značné části zubního epitelu a odpovídala místu vznikajícího sklovinného uzlu. Epitel Tabby zárodků se oproti kontrole výrazně lišil tvarem i velikostí. Byl menší, se snížením ve střední části pupene, díky kterému připomínal spíše pohárek. *Shh* exprese u Tabby zaujímalá oproti WT viditelně menší plochu. Podobná situace přetrvávala i na ED 15,0 – 15,5, kde byla *Shh* expresní doména u Tabby co do plochy opět menší oproti WT a zubní epitel zaujímal opět menší plochu i pozměněný tvar (obr. 20).

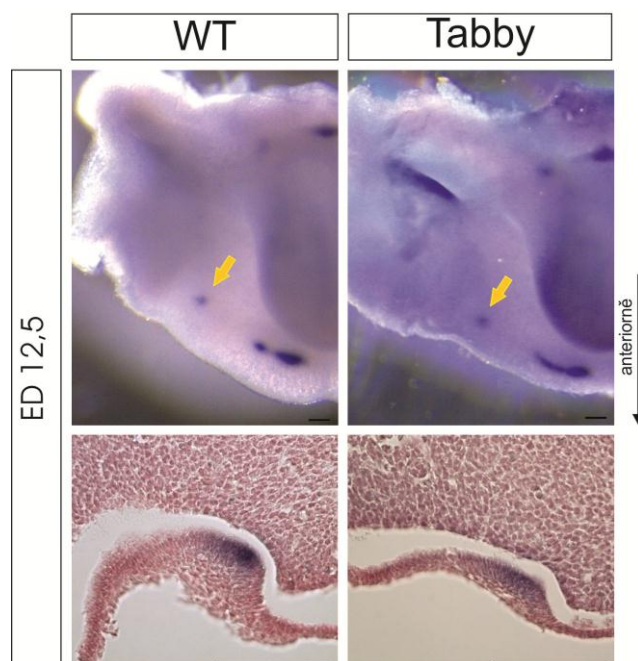


Obrázek 20. Expresse *Shh* na frontálních řezech dolní čelisti WT a Tabby embryí vizualizovaná pomocí WISH. Na ED 13,5 je u WT zárodků *Shh* exprimován na vrcholku zubního pupene, u Tabby zárodků *Shh* exprese chybí. Na ED 14,5 je *Shh* expresní doména u WT viditelně větší oproti Tabby, stejně tak tomu je i na ED 15,0 – 15,5. Měřítka znázorňuje 100 μ m.

Provedli jsme srovnání získaných výsledků u Tabby a kontrol pro jednotlivé embryonální dny.

4.2.1 ED 12,5

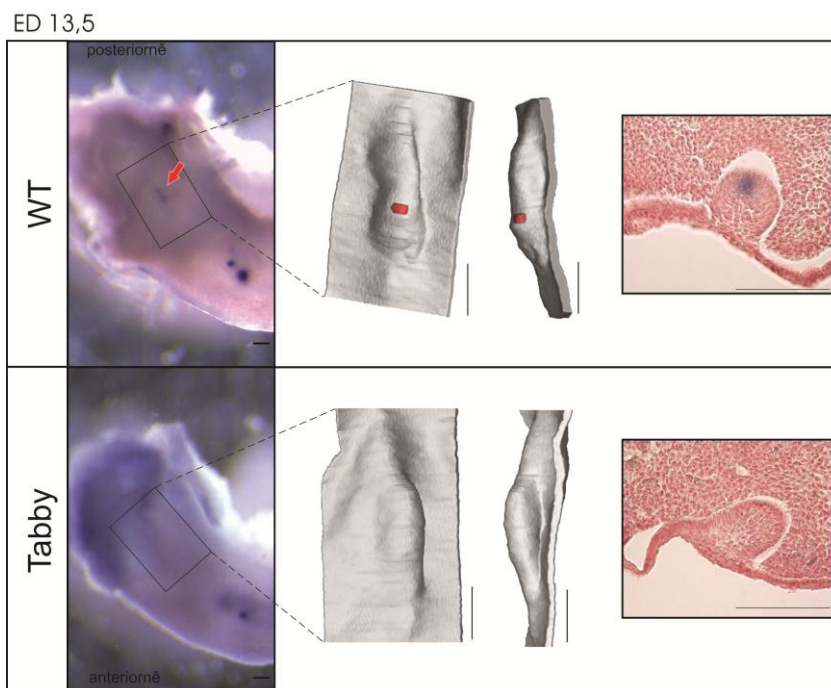
Na embryonálním dni 12,5 a hmotnostech 53 - 85 mg jsme na všech vzorcích v tvářové oblasti detekovali bodovou *Shh* expresní doménu, nacházející se posteriorně od podlouhlé *Shh* domény v řezákové oblasti. Tato bodová doména se nelišila mezi Tabby a WT zárodky. Pohled na histologické řezy stejných vzorků potvrdil, že se velikost ani umístění *Shh* signálu neliší (obr. 21). Tvarem epitel na histologických řezech připomínal MS (Viriot et al., 2000). Tím jsme potvrdili předpoklad, že je tato *Shh* exprese lokalizována podobně, jako rudiment v oblasti diastemy, mesiální segment (MS), který je pro tento embryonální den charakteristický.



Obrázek 21. Exprese *Shh* v tvářové oblasti u WT (85 mg) a Tabby (65 mg) zárodků stáří ED 12,5. Žlutá šipka značí bodovou *Shh* expresní doménu patřící rudimentu MS. Měřítka znázorňuje 100 μ m.

4.2.2 ED 13,5

V dolní čelisti o jeden den starších zárodků jsme detekovali *Shh* expresi pouze u kontrolních (WT) vzorků. Na nejméně vývojově pokročilých vzorcích na ED 13,5 stále přetrvávala signální doména patřící rudimentu MS. Byly to dolní čelisti embryí o hmotnostech nejnižších na tomto ED (75 – 85 mg). Zárodky o hmotnostech 99 – 123mg neměly v tvářové oblasti známky *Shh* exprese, avšak u nejtěžších zárodků (od 127mg) jsme opět detekovali *Shh* expresní doménu (obr. 22). Na histologických řezech bylo podle tvaru epitelu patrné, že se již nejedná o MS, nýbrž o druhý, zadní rudiment diastemové oblasti, označovaný R2. Tento nález potvrdila 3D rekonstrukce zubního epitelu, která jasně ukázala, že *Shh* signální doména se nachází v anteriorní části epitelu, těsně za jeho nejvyšším vrcholem. Toto nejvyšší (ve skutečnosti nejhlubší) místo je na tomto embryonálním dni charakteristické pro rudiment R2. Zubní epitel Tabby měl na 3D rekonstrukci hladký tvar, chybělo zvýšení v anteriorní části charakteristické pro R2, stejně tak jako chyběla charakteristická *Shh* exprese (obr. 22).

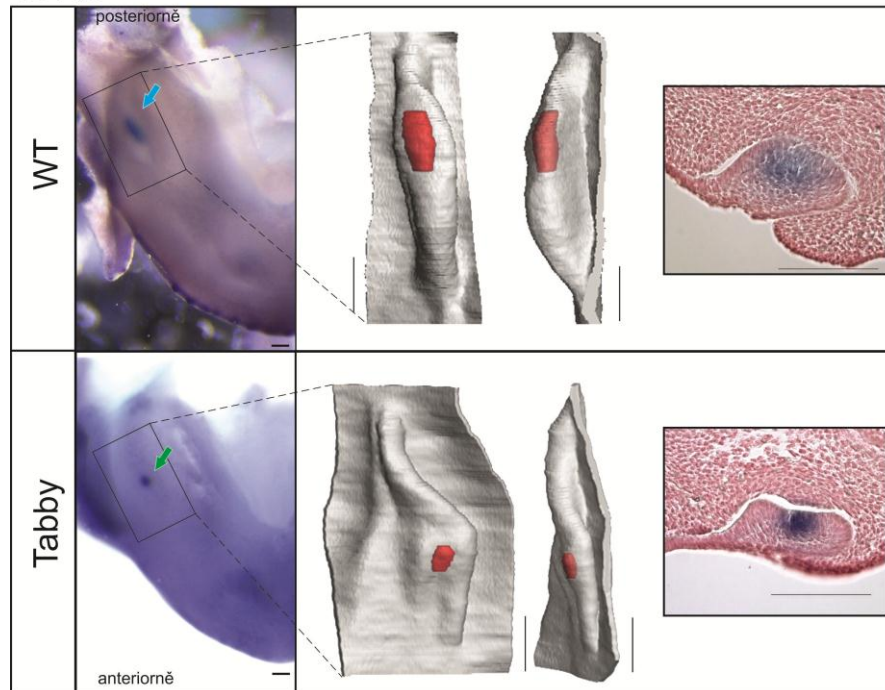


Obrázek 22. Přehledné srovnání situace v tvářové oblasti na ED 13,5 mezi WT (127 mg) a Tabby (130 mg). Expres *Shh* vizualizovaná pomocí WISH, 3D rekonstrukce zubního epitelu s červeně označenou *Shh* expresní doménou – pohled od mezenchymu a bukální pohled, frontální řez dolní čelisti v místě *Shh* signálu (WT) a v nejvyšším místě zubního epitelu (Ta). Červená šipka označuje místo exprese *Shh* v tvářové oblasti. Měřítko znázorňuje 100 μ m.

4.2.3 ED 14,5

Na embryonálním dni 14,5 jsme opět detekovali *Shh* expresi u WT i Tabby zárodků. U WT jsme detekovali *Shh* signální doménu u nejlehčích (128 – 163 mg) a u nejtěžších (190 – 242 mg) vzorků. Vzorky spadající hmotností mezi tyto dvě skupiny (169 – 184 mg) známky *Shh* exprese v tvářové oblasti nevykazovaly. První exprese detekovaná na vývojově nejméně pokročilých zárodcích odpovídala signálnímu centru R2 rudimentu, zatímco vývojově pokročilé zárodky již vykazovaly expresi odpovídající první stoličce M1. To potvrdil i tvar a posteriorní umístění signální domény na 3D rekonstrukcích (obr. 23). Situace u Tabby se na tomto dni značně lišila. Nejlehčí vzorky (100 – 155 mg), které hmotností odpovídaly vzorkům WT s *Shh* signalizací v R2, byly na *Shh* negativní. Od hmotnosti 162 mg se začal objevovat slabý, ale jasný signál *Shh*, který s přibývajícím hmotností zesiloval. Tato hmotnost byla naopak u WT na *Shh* negativní. Epitel Tabby čelistí vykazoval změny srovnatelné s literaturou (Peterkova et al., 2002a). Místo jednoho širokého valu se v přední části epitelu vyvíjely dva užší valy oddělené rýhou a v tomto místě ležela *Shh* expresní doména (obr. 23). Vzhledem ke skutečnosti, že se doména lišila časem, umístěním i rozsahem, nebylo jasné, jakému zubnímu základu exprese náleží.

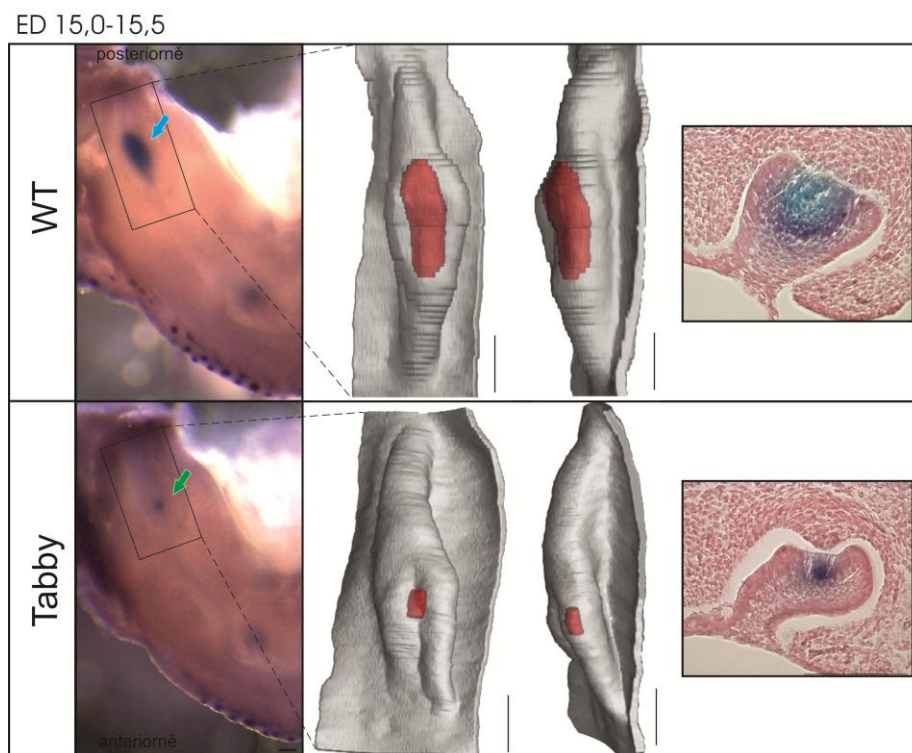
ED 14,5



Obrázek 23. Přehledné srovnání situace v tvářové oblasti na ED 14,5 mezi WT (216 mg) a Tabby (205 mg). Expres *Shh* vizualizovaná pomocí WISH. 3D rekonstrukce zubního epitelu se znázorněnou *Shh* doménou (červeně) – pohled od mezenchymu a bukalní pohled. Frontální řez dolní čelistí v místě *Shh* signálu. Šipky označují místo exprese *Shh* v tvářové oblasti. Měřítka znázorňuje 100 μ m.

4.2.4 ED 15,0 – 15,5

Až na několik Tabby vzorků (kolem 260 mg), jsme detekovali *Shh* expresi na všech zárodcích Tabby i WT (200 – 336 mg). Rozsáhlá exprese *Shh* v epitelu kontrolních vzorků, která se rozšířila i do přední části zubního pohárku jasně potvrdila vznik primárního sklovinného uzlu v první stoličce. Situace u Tabby však zůstala podobná předchozímu ED. Zubní epitel měl v přední části stále tvar dvou valů s rýhou uprostřed, *Shh* signální doména stále setrvala v místě rýhy a rozsahem se zdaleka neblížila doméně u WT (obr. 24). Stále se tedy nedalo určit, jaký zubní základ u Tabby na tomto dni dominuje.

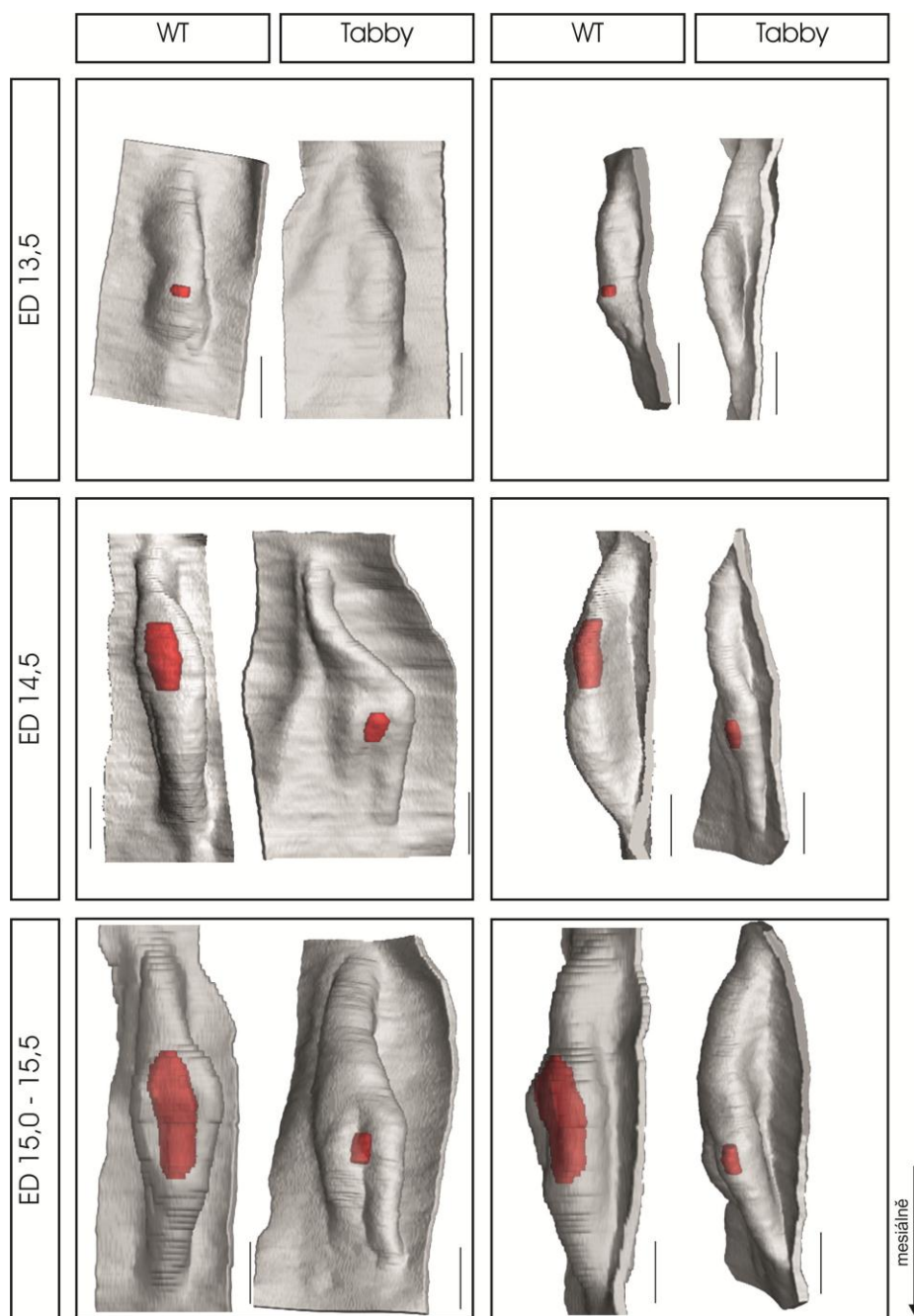


Obrázek 24. Přehledné srovnání situace v tvářové oblasti na ED 15,0 - 15,5 mezi WT (240 mg) a Tabby (255mg). Expres *Shh* vizualizovaná pomocí WISH. 3D rekonstrukce zubního epitelu se znázorněnou *Shh* doménou (červeně) – pohled od mezenchymu a bukální pohled. Frontální řez dolní čelisti v místě *Shh* signálu. Šipky označují místo exprese *Shh* v tvářové oblasti. Měřítko znázorňuje 100 μ m.

4.2.5 Analýza 3D rekonstrukcí

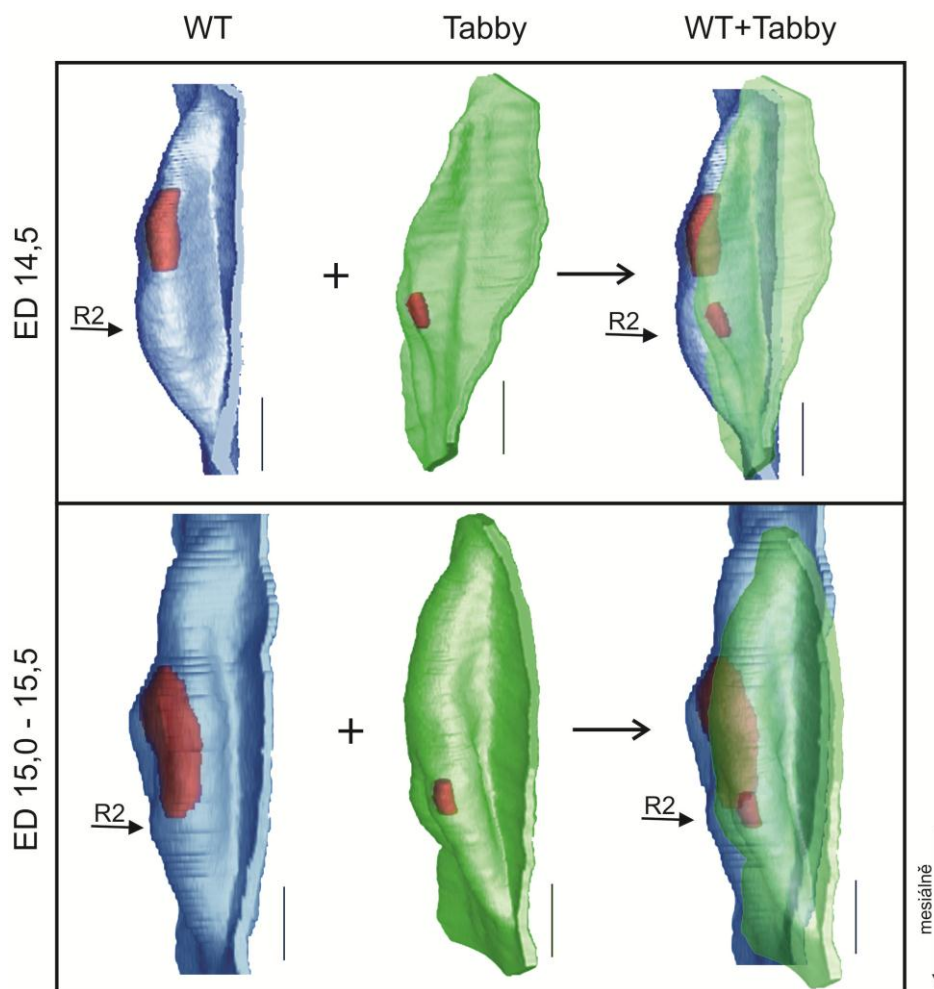
Abychom dokázali určit, jaký zubní základ se u Tabby vyvíjí na ED 14,5, porovnali jsme 3D rekonstrukce zubního epitelu s WT zárodky (obr. 25).

Jednotlivá vývojová stádia u WT tvarově odpovídají normálnímu vývoji zubního základu. Na ED 13,5 se *Shh* exprimuje v nejvyšší, anteriorní části zubního epitelu, v místě R2 rudimentu. Tabby zárodky na tomto ED žádnou expresi nevykazují a jejich zubní epitel postrádá charakteristickou vyvýšenou anteriorní část R2 rudimentu. Na jejím místě se u Tabby teprve na ED 14,5 vytvoří struktura, která exprimuje *Shh*, avšak připomíná dva valy s rýhou uprostřed. Stejná struktura přetrvává i s *Shh* expresí na ED 15,5. V době, kdy se u Tabby tvoří v anteriorní části dva valy, mezi nimiž začíná exprese *Shh*, se u WT přesouvá exprese do posteriorní části zubního epitelu a postupně se rozšiřuje anteriorně na ED 15,0-15,5. Tato exprese odpovídá primárnímu sklovinnému uzlu první stoličky. Podobná exprese u Tabby nebyla na těchto stádiích detekována.



Obrázek 25. *Shh* exprese na 3D rekonstrukcích zubního epitelu tvářové oblasti WT a Tabby embryí. Tabby (130 mg, 205 mg, 255 mg), WT (127 mg, 216 mg, 240 mg). Červená barva značí expresi *Shh*. Měřítka znázorňuje 100μm.

Překrytým 3D rekonstrukcí zubního epitelu Tabby a WT zárodků jsme zjistili, že na ED 14,5 i 15,0 -15,5 je *Shh* exprese u Tabby patrná v místě, kde se u WT na ED 13,5 vyvíjí R2 rudiment (obr 26).



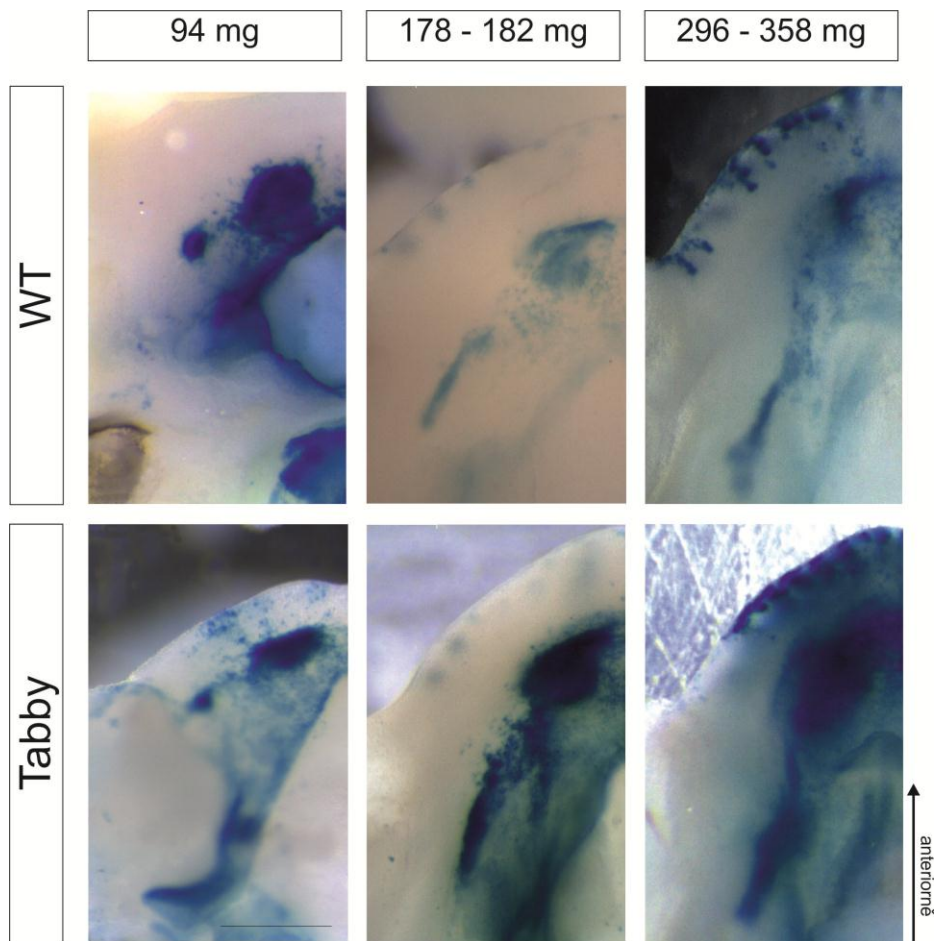
Obrázek 26. Korelace pozice *Shh* expresní domény mezi Tabby a WT embryi.

ED 14,5 a 15,0 – 15,5. Rekonstrukce WT zárodků (216 mg, 240 mg) jsou označeny modře, Tabby (205 mg, 255 mg) zeleně. Šipka s R2 značí místo vyvíjejícího se rudimentu R2 u WT embryí. Na překryvu 3D rekonstrukcí je patrné, že místo exprese *Shh* v Tabby čelisti odpovídá lokalizaci R2 rudimentu v čelisti WT embryí. Měřítka znázorňuje 100 μ m.

Jelikož byl na některých stádiích *Shh* signál u Tabby velmi slabý, chtěli jsme ověřit, zda v dolní čelisti Tabby embryí opravdu existují oblasti, kde *Shh* exprese oproti WT embryím zcela chybí nebo zda jsme ji pouze nebyli schopni detekovat pomocí WISH, jelikož byla oproti WT zeslabena.

Použili jsme proto reportérové myši Tabby-Rosa26LacZ, jejichž embrya vzniklá křížením s Tabby-Shh(EGFP/cre) mají po inkubaci se substrátem X-gal modré všechny buňky, které kdykoli během vývoje exprimovaly *Shh*. Výhodou je, že exprese *Shh* v jakémkoli množství se vždy projeví jako modré zbarvení a odhalí tedy i velmi slabou expresi.

Tento pokus ukázal, že exprese *Shh* je u Tabby a WT shodná. Neprokázali jsme žádnou oblast, kde by exprese *Shh* u Tabby chyběla (obr. 27).



Obrázek 27. Kvadranty dolní čelisti, kde jsou modře označeny všechny buňky, které během vývoje exprimovaly *Shh*. Tabby zárodky na ED 13,5 (94 mg), 14,5 (182 mg), 15,5 (358 mg) a WT zárodky na ED 12,5 (94 mg), 13,5 (178 mg), 15,5 (296 mg). Měřítka znázorňují 500 μ m.

5 Diskuse

5.1 Řezáková oblast

Prokázali jsme, že u Tabby myši je v řezákové oblasti dolní čelisti viditelně snížena *Shh* exprese ve vyvíjejícím se funkčním řezáku od ED 14,5 a hmotnosti 136 mg. 3D rekonstrukce potvrdila, že zubní pohárek je oproti WT myším viditelně menší. Exprese na časnějších vývojových stádiích byla shodná s expresí u WT myši.

Z literatury je známo, že řezákové primordium u Tabby zárodků začíná na ED 13,5 vykazovat morfologické změny oproti WT embryím, a jeho vývojové poškození se v průběhu vývoje stupňuje. Na pozdějších stádiích prenatalního vývoje je 100% primordií dolních řezáků hypoplastických a vykazuje morfologické změny oproti kontrole (Miard et al., 1999). My jsme však na ED 13,5 a u vývojově méně pokročilých embryí (s menší tělesnou hmotností) na ED 14,5 nepozorovali změnu *Shh* exprese. Donedávna byla veškerá exprese v řezákové oblasti na všech ED považována za expresi primordia funkčního řezáku (Cobourne et al., 2004; Munne et al., 2010). Avšak bylo prokázáno, že na raných stádiích (ED 12,5 – 13,5) ještě *Shh* exprese v řezákové oblasti neodpovídá budoucímu funkčnímu řezáku. Tato časná exprese je lokalizovaná mimo pupen funkčního řezáku, do oblasti epitelového propojení pupenu s vestibulárním epitelem, kde se vyvíjí rudimentární (prelakteální) zub (Hovorakova et al., 2011). Z toho vyplývá, že námi pozorovaná nezměněná *Shh* exprese nepatřila poškozenému funkčnímu řezáku, nýbrž rudimentárnímu (prelakteálnímu) zubnímu primordiu v řezákové oblasti.

Od ED 14,5 a hmotnosti 136 mg jsme zaznamenali vznik druhé, posteriorně umístěné *Shh* expresní domény, jejíž vizualizace na 3D rekonstrukci potvrdila, že je lokalizována v pohárku vyvíjejícího se funkčního řezáku. Tato doména byla oproti WT viditelně menší, co do plochy i síly. Tento náález je v souladu s morfologickými daty, která popisují hypoplázii a pozměněný vývoj základu funkčního řezáku (Miard et al., 1999).

Vzhledem ke zjištění, že vývoj prelakteálního řezáku není u Tabby ovlivněn se zdá, že je jeho vývoj na funkčnosti *Eda* genu (Tabby) nezávislý. Tento rudimentární řezák je malý, velmi primitivní zub (Fitzgerald, 1973; Woodward, 1894). Je podobný zubům nižších obratlovců (ryby, plazi). Zajímavá je skutečnost, že zatímco se během odontogeneze u savců nachází *Eda*

exprese v epitelu (Tucker et al., 2000), u ryb je popsána exprese *Eda* v mezenchymu - v těsném okolí zubního základu, kde prostorově vymezuje místo vzniku zubu. Předpokládá se, že funkcí *Eda* u ryb je indukovat a udržovat expresi *Shh* v zubním základu a tím podporovat jeho vývoj (Fraser et al., 2008). Je tedy zajímavé, že u myši, kde se exprese *Eda* přesunula z mezenchymu do epitelu, také klesla důležitost *Eda* pro vývoj primitivních zubů. To naznačuje náš nálezn, že vývoj zubního epitelu rudimentárního řezáku a jeho *Shh* exprese na časných stádiích nebyly narušeny.

Vývoj funkčního řezáku byl oproti tomu ztrátou *Eda* genu ovlivněn. Nejen jeho zubní epitel, ale i *Shh* expresní doména byly výrazně hypoplastické. Je známo, že *Shh* exprese je u Tabby ve vyvíjejícím se tvárovém zubu snížena (Kangas et al., 2004; Pispá et al., 1999) a předpokládá se, že jedním z cílů *Eda* signální dráhy je právě *Shh* (Pummila et al., 2007). Nám se povedlo prokázat stejný efekt snížení *Shh* exprese u vyvíjejícího se funkčního řezáku Tabby embryí, který odpovídá jeho již dříve popsané hypoplázii (Miard et al., 1999).

5.2 Tvářová oblast

Časoprostorové uspořádání *Shh* exprese v tvářové oblasti u Tabby neodpovídalo uspořádání u WT zárodků. Výjimku tvořila exprese na ED 12,5, která se u Tabby i WT zárodků shodovala. U Tabby však zcela chyběla exprese na ED 13,5, která byla charakteristická pro signální centrum rudimentu R2 u WT myši. Na ED 14,5 se naopak *Shh* exprese u Tabby objevila dříve. Celkově byla *Shh* exprese na ED 13,5 – 15,5 v porovnání s WT zárodky slabší.

Embryonální myši dentice obsahuje v tvářové oblasti dolní čelisti dva velké rudimenty, které jsou dominantními strukturami na ED 12,5 (MS) a 13,5 (R2) (Viriot et al., 2000) a exprimují geny kódující signální molekuly charakteristické pro signální centrum vyvíjející se první stoličky M1 (Procházka et al., 2010). Tato signální centra však byla dlouhou dobu mylně přisuzována výhradně M1. U Tabby nebyly zatím tyto rudimenty popsány a veškerá exprese v tvářové oblasti je opět připisována stoličkám (Pispá et al., 1999).

Podařilo se nám prokázat, že vývoj rudimentu MS, objevujícího se v tvářové oblasti nejdříve (ED 12,5), zůstává u Tabby na morfologické úrovni a úrovni *Shh* exprese nezměněn.

První morfologický rozdíl (menší pupen) při vývoji zubů v tvářové oblasti Tabby myši oproti kontrole, byl pozorován na ED 13 (Pispá et al., 1999). Toto pozorování koreluje s naším nálezem, že se změna v expresi *Shh* oproti WT zárodkům objevila na ED 13,5. První

morfologická změna se tedy nejspíš bude odehrávat v podobném čase, jako změna na signalizační úrovni, avšak který z dějů předchází a který je následkem, s jistotou určit nemůžeme. U WT myši na tomto ED dominuje tvářové oblasti pupen rudimentu R2. Podobný R2 pupen u Tabby chybí (Peterkova et al., 2002a) a zubní epitel v tomto místě postrádal expresi *Shh* (obr. 19). Ta se objevila až o den později, sice na místě shodném se signálním centrem R2 u WT embryí, avšak chyběla typická morfologická struktura R2 rudimentu. Místo ní se vytvořily dva valy s rýhou uprostřed (obr. 20, 23). Zajímavá je skutečnost, že *Shh* signální doména lokalizovaná v rýze mezi valy zubního epitelu u Tabby, se objevuje v době negativní periody mezi expresí R2 a M1 u WT myši.

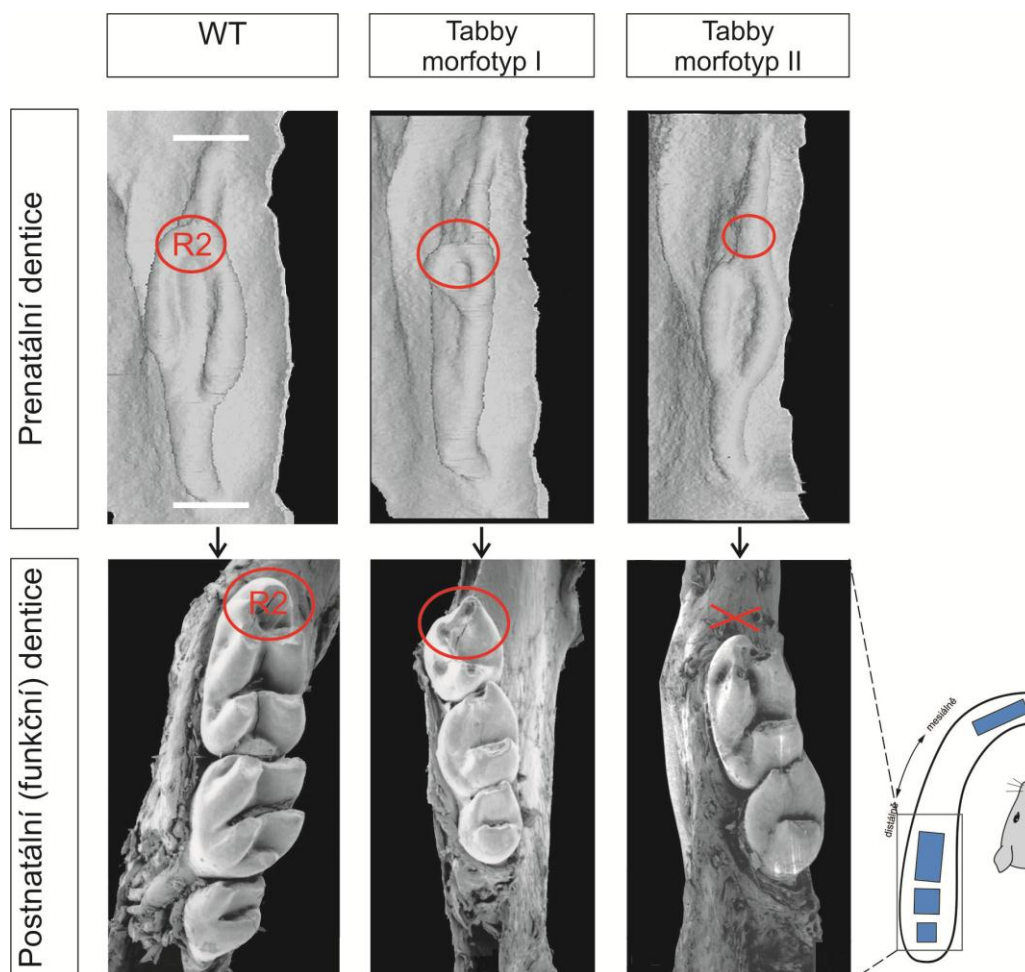
Jedna z hypotéz by tedy mohla být, že se R2 rudiment u Tabby vůbec nevyvíjí, díky tomu nevytváří ve svém okolí inhibiční pole (jak je popsáno např. při vývoji zubů u ryb (Fraser et al., 2008), ale také při vývoji jiných ektodermálních derivátů u savců (Hogan, 1999) a vývoj základu prvního funkčního tvářového zubu se díky tomu urychlí. Pokud by tomu tak bylo, a *Shh* expresní doména pozorovaná na ED 14,5 by tomuto základu funkčního zubu patřila, měl by se jeho pohárek vyvíjet více vpředu oproti pohárku M1 u WT zárodků a pravděpodobně by měl být také dříve patrný. My jsme však ani jeden z uvedených dějů nezaznamenali. Na ED 15,0 – 15,5 vypadala situace u Tabby zárodků téměř shodně. Jediným rozdílem byl nárůst zubního epitelu směrem do mezenchymu, což je pro vývoj zubu nepostradatelný a proto předvídatelný děj. Pokud by podle zmíněné hypotézy byly dva valy předzvěstí vývoje poškozeného pohárku, měl by být po vývoji trvajícím celý embryonální den pohárek patrný. Nasnadě by také bylo rozšíření signálního centra, avšak *Shh* exprese zaujímal po nárůstu hmotnosti o 50 mg (což je 1/5 hmotnosti) stále stejnou plochu. Nepravděpodobnost této hypotézy podporují také výsledky předchozích výzkumů prenatalní Tabby dentice. Ty ukazují, že na ED 15,5 se u vývojově pokročilejších embryí (301 – 350 mg) vytváří pohárek, který se však rozhodně nevyvíjí více vpředu oproti WT embryím. Tato skutečnost platí pro všech 5 morfotypů Tabby dentice (Peterkova et al., 2002a) (obr. 12).

Skutečnost, že se u Tabby později na ED 15,5 vyvine pohárek, podporuje druhou hypotézu. Podle té patří signální centrum reprezentované *Shh* expresí v rýze mezi dvěma valy u Tabby na ED 14,5 opožděnému, malformovanému R2 rudimentu, jehož vývoj pokračuje i na časných stádiích na ED 15,5. Vývoj dalšího primordia tvářového zubu je tím pádem déle inhibován, a proto se začíná vyvíjet později než M1 u WT zárodků. Této hypotéze dodává na důvěryhodnosti fakt, že předozadní lokalizace *Shh* exprese se u Tabby na ED 14,5 a u WT na

ED 13,5 shoduje (obr. 25). Dalším podpůrným bodem je vysvětlení malé mezery v expresi *Shh* u Tabby na ED 15,0 – 15,5 a hmotnosti kolem 260 mg (graf 3). Ta by mohla oddělovat vývoj R2 do hmotnosti zárodků 260 mg od vývoje prvního funkčního tvářového zubu od hmotnosti zárodků cca 270 mg.

Použití myši s reportérovými geny odhalilo, že oblasti lokalizace buněk, které v minulosti exprimovaly *Shh* se u Tabby a kontrol neliší. To tedy znamená, že kromě snížení síly *Shh* exprese v tvářové oblasti dolní čelisti (které již bylo v tvářové oblasti u Tabby popsáno, Kangas et al., 2004; Pispá et al., 1999), způsobilo narušení *Eda* signální dráhy, změnu v časoprostorovém uspořádání *Shh* exprese. Ačkoli tedy byla lokalizace buněk, které v minulosti exprimovaly *Shh* ve všech místech dolní čelisti Tabby shodná s kontrolou, způsobí časoprostorové změny *Shh* exprese závažné změny při vývoji dentice. Otázkou zůstává, zda narušení *Eda* signální dráhy ovlivní pouze sílu exprese *Shh*, jejíž snížení má pak v kontextu ostatních signálních molekul a transkripčních faktorů podílejících se na vývoji zubů za následek narušení časoprostorového uspořádání jeho působení. Nebo zda *Eda* signální dráha ovlivňuje více aspektů *Shh* exprese (síla, lokalizace v prostoru a čase), které jsou u Tabby abnormální.

Nezodpovězenou otázkou zůstává také oblast otazníků v grafu 3. Jde o zárodky, v jejichž tvářové oblasti dolní čelisti jsme zaznamenali velmi slabé zbarvení, které se nedalo prohlásit za signál, avšak nedalo se ani přejít tvrzením, že zde signál není. Vysvětlení této otázky je skryto ve složitosti problematiky Tabby tvářové dentice. Tu lze rozdělit na dva hlavní morfotypy, které se dále dělí na podskupiny. Lze je odlišit nejen v postnatálním (Kristenova et al., 2002), ale již v prenatálním (Peterkova et al., 2002a) období. Díky této variabilitě je nutné počítat i s variabilitou v rámci vývoje signálních center. Vzhledem ke skutečnosti, že v žádném místě Tabby epitelu *Shh* exprese oproti kontrole nechyběla, se domníváme, že slabé zbarvení vzorků, bude nejspíš slabá *Shh* exprese, kterou nelze metodou WISH s jistotou detekovat. Hypotetický průběh vývoje zubů tvářové oblasti dolní čelisti u jednotlivých Tabby morfotypů znázorňuje následující schéma (obr. 28).

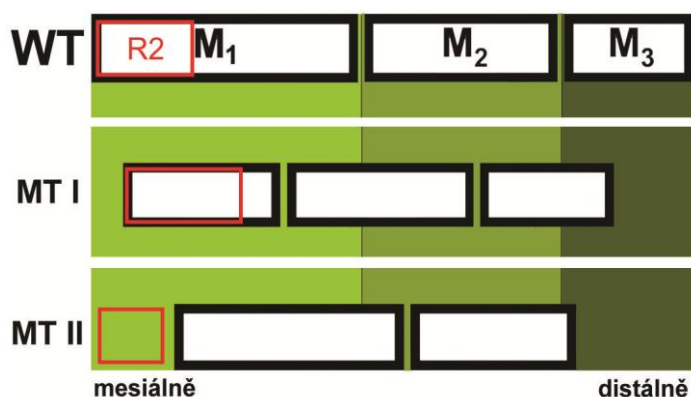


Obrázek 28. Schéma hypotézy vývoje jednotlivých morfortypů u Tabby. Prenatální zubní základy na ED 15,5 (301 – 350 mg). Červené kolečko značí místo, které hypoteticky odpovídá hmotě rudimentu R2. Červený křížek značí oblast, kde R2 zanikl a svou hmotou funkčnímu zubu nepřispěl. Schéma kvadrantu myši dolní čelisti (vpravo) vysvětluje, která oblast je sledována. (3D rekonstrukce převzaty z Peterkova et al., 2002a), (fotografie převzaty z Kristenova et al., 2002).

U WT zárodků se R2 rudiment vyvíjí na ED 13,5. Poté se jeho hmota začleňuje do přední části M1, který přestává být rudimentem R2 inhibován a může se vyvíjet (Prochazka et al., 2010). Na ED 15,5 je již hmota R2 začleněna do přední části zubního základu M1.

Tabby morfortyp I (MT I) obsahuje v dentici 3 tvářové zuby, avšak jsou menší a prostorově posunuté oproti WT embryím. Za nejpravděpodobnější považujeme hypotetické vysvětlení, že R2 se u Tabby embryí vlivem deficitu ektodysplasinu začíná vyvíjet později, a vyvíjí se déle, až dá nakonec vznik větší části prvního funkčního tvářového zubu. Zároveň během vývoje déle inhibuje za ním ležící zubní epitel. Ten svou polohou odpovídá zadní části M1 u WT zárodků a svou hmotu rozdělí mezi první a druhý funkční tvářový zub u Tabby myši. Tím je porušena segmentace zubního epitelu typická pro normální vývoj tvářových zubů u WT embryí (obr. 29).

U morfotypu II (MT II) se R2 vytváří dříve oproti MT I, a přibližně ve stejnou dobu jako u WT zárodků. Vzhledem k nedostatečné *Shh* expresi (viz. otazníky v grafu 3), však vytvoří jen hypoplastický pupen, který zaniká, aniž by svou hmotou přispěl k vzniku prvního tvářového zubu. Primordium prvního funkčního tvářového zubu tak postrádá přední část. Díky tomu, že hypoplastický, zanikající R2 nevytváří inhibiční zónu, vývoj za ním ležícího primordia (prvního funkčního zubu) se urychlí oproti MT I. Jeho pohárek se tak nejvíce podobá pohárku M1 u WT embryí (obr. 28). Protože R2 u MT II zaniká a u MT I tvoří dle naší hypotézy větší část prvního tvářového zubu, mají myši s MT II pouze dva funkční tvářové zuby.



Obrázek 29. Schéma segmentace dentálního epitelu u WT a Tabby morfotypů (MT I, MT II).

Bílé obdélníky znázorňují funkční tvářové zuby, červené obdélníky znázorňují oblast tvořenou hmotou rudimentu R2. Jednotlivá pole odlišená odstíny zelené barvy vyznačují oblasti zubního epitelu, které dávají u WT vznik M1 (světlá), M2 (tmavší), M3 (tmavá). Nelze vyloučit, že v důsledku poruchy vývoje R2 dochází u Tabby embryí k narušení této segmentace a funkční tvářové zuby u Tabby tak vznikají z přilehlých částí dvou sousedních zubů WT embryí.

Předpokládá se, že rudimentární primordia během normogeneze dentice determinují pozici následně se vyvíjejícího zubu (Hovorakova et al., 2011; Prochazka et al., 2010). Naše výsledky nasvědčují tomu, že v řezákové oblasti je nejspíš tato funkce rudimentů u Tabby zárodků zachována, avšak je zřejmě porušena v tvářové oblasti při determinaci polohy M1 rudimentem R2. Důsledkem toho by pak mohla být porucha segmentace zubního epitelu.

6 Závěr

1. Podařilo se potvrdit hypotézu, že také u Tabby embryí nepatří *Shh* exprese na časných vývojových stádiích (ED 12,5 – 13,5) funkčnímu řezáku, nýbrž primordiu rudimentárního (prelakteálního) myšího řezáku. Tato exprese se svou intenzitou a rozsahem nelišila od exprese u WT embryí.

Potvrdila se také hypotéza, že ke změnám v *Shh* expresi v oblasti dolního funkčního řezáku u Tabby embryí dochází kolem ED 13,5 – současně s jeho prvními morfologickými změnami. Expresa *Shh* byla viditelně snížena, což odpovídá v literatuře popsané hypoplázii dolního funkčního řezáku, která se vyskytuje prenatálně ve 100% případech.

2. Hypotéza, že v tvářové oblasti dolní čelisti Tabby zárodků chybí exprese *Shh* v místě, kde se u WT zárodků vyvíjí R2, byla vyvrácena. Ve většině případů byla tato exprese přítomna, ale našli jsme ji později oproti WT zárodkům. Nacházela se ve struktuře, která pravděpodobně patří R2, avšak jeho vývoj byl opožděný a poškozený, nejspíš vlivem nedostatečné EDA signalizace. Na základě těchto výsledků byla formulována představa, že se při vzniku anomálie R2 rudimentu uplatňuje především vývojové opoždění v případě Tabby morfotypu I, a hypoplázie v případě Tabby morfotypu II.

Pro potvrzení nebo vyvrácení této představy bude třeba zaměřit budoucí studie na analýzu vývojově starších embryí, která již mají v dolní čelisti vyvinutý pohárek prvního funkčního zubu. Vhodné bude především použití metod časosběrné mikroskopie, která umožní sledovat vývoj a osud jednotlivých struktur dolní čelisti Tabby embryí ve vzájemném časoprostorovém kontextu.

7 Seznam použité literatury

- Bayes, M., Hartung, A. J., Ezer, S., Pispá, J., Thesleff, I., Srivastava, A. K., and Kere, J. (1998). The anhidrotic ectodermal dysplasia gene (EDA) undergoes alternative splicing and encodes ectodysplasin-A with deletion mutations in collagenous repeats. *Human Molecular Genetics* 7, 1661-1669.
- Bei, M., Kratochwil, K., and Maas, R. L. (2000). BMP4 rescues a non-cell-autonomous function of Msx1 in tooth development. *Development* 127, 4711-4718.
- Boran, T., Lesot, H., Peterka, M., and Peterkova, R. (2005). Increased apoptosis during morphogenesis of the lower cheek teeth in tabby/EDA mice. *Journal of Dental Research* 84, 228-233.
- Bossen, C., Ingold, K., Tardivel, A., Bodmer, J. L., Gaide, O., Hertig, S., Ambrose, C., Tschopp, J., and Schneider, P. (2006). Interactions of tumor necrosis factor (TNF) and TNF receptor family members in the mouse and human. *Journal of Biological Chemistry* 281, 13964-13971.
- Butler, P. M. (1956). The ontogeny of molar pattern. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 31, 30-70.
- Cermakova, P., Peterka, M., Capkova, J., Tureckova, J., Ruch, J. V., Lesot, H., and Peterkova, R. (1998). Comparison of the tooth shape and size in tabby and non-tabby mice. *Acta Veterinaria Brno* 67, 3-+.
- Chen, Y. P., Bei, M., Woo, I., Satokata, I., and Maas, R. (1996). Msx1 controls inductive signaling in mammalian tooth morphogenesis. *Development* 122, 3035-3044.
- Cobourne, M. T., Miletich, I., and Sharpe, P. T. (2004). Restriction of sonic hedgehog signalling during early tooth development. *Development* 131, 2875-2885.
- Courtney, J. M., Blackburn, J., and Sharpe, P. T. (2004). The Ectodysplasin and NF kappa B signalling pathways in odontogenesis. Paper presented at: 8th International Conference on Tooth Morphogenesis and Differentiation (York, ENGLAND).
- Cui, C. Y., and Schlessinger, D. (2006). EDA signaling and skin appendage development. *Cell Cycle* 5, 2477-2483.
- Dassule, H. R., Lewis, P., Bei, M., Maas, R., and McMahon, A. P. (2000). Sonic hedgehog regulates growth and morphogenesis of the tooth. *Development* 127, 4775-4785.
- Dassule, H. R., and McMahon, A. P. (1998). Analysis of epithelial-mesenchymal interactions in the initial morphogenesis of the mammalian tooth. *Developmental Biology* 202, 215-227.
- Elomaa, O., Pulkkinen, K., Hannelius, U., Mikkola, M., Saarialho-Kere, U., and Kere, J. (2001). Ectodysplasin is released by proteolytic shedding and binds to the EDAR protein. *Human Molecular Genetics* 10, 953-962.
- Falconer, D. S. (1952). A totally sex-linked gene in the house mouse. *Nature* 169, 664-665.

- Ferguson, B. M., Brockdorff, N., Formstone, E., Ngyuen, T., Kronmiller, J. E., and Zonana, J. (1997). Cloning of Tabby, the murine homolog of the human EDA gene: evidence for a membrane-associated protein with a short collagenous domain. *Human Molecular Genetics* 6, 1589-1594.
- Fitzgerald, L. R. (1973). Deciduous incisor teeth of the mouse (*Mus musculus*). *Archives of Oral Biology* 18, 381 - 389.
- Fraser, G. J., Bloomquist, R. F., and Streelman, J. T. (2008). A periodic pattern generator for dental diversity. *Bmc Biology* 6.
- Gaide, O., and Schneider, P. (2003). Permanent correction of an inherited ectodermal dysplasia with recombinant EDA. *Nature Medicine* 9, 614-618.
- Grüneberg, H. (1965). Genes and genotypes affecting the teeth of the mouse. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 14, 137-159.
- Hardcastle, Z., Mo, R., Hui, C. C., and Sharpe, P. T. (1998). The Shh signalling pathway in tooth development: Defects in Gli2 and Gli3 mutants. *Development* 125, 2803-2811.
- Headon, D. J., Emmal, S. A., Ferguson, B. M., Tucker, A. S., Justice, M. J., Sharpe, P. T., Zonana, J., and Overbeek, P. A. (2001). Gene defect in ectodermal dysplasia implicates a death domain adapter in development. *Nature* 414, 913-916.
- Headon, D. J., and Overbeek, P. A. (1999). Involvement of a novel Tnf receptor homologue in hair follicle induction. *Nature Genetics* 22, 370-374.
- Hogan, B. L. M. (1999). Morphogenesis. *Cell* 96, 225-233.
- Honda, M. J., Tsuchiya, S., Sumita, Y., Sagara, H., and Ueda, M. (2007). The sequential seeding of epithelial and mesenchymal cells for tissue-engineered tooth regeneration. *Biomaterials* 28, 680-689.
- Hovorakova, M., Prochazka, J., Lesot, H., Smrckova, L., Churava, S., Boran, T., Kozmik, Z., Klein, O., Peterkova, R., and Peterka, M. (2011). Shh Expression in a Rudimentary Tooth Offers New Insights Into Development of the Mouse Incisor. *Journal of Experimental Zoology Part B-Molecular and Developmental Evolution* 316B, 347-358.
- Jernvall, J., Aberg, T., Kettunen, P., Keranen, S., and Thesleff, I. (1998). The life history of an embryonic signaling center: BMP-4 induces p21 and is associated with apoptosis in the mouse tooth enamel knot. *Development* 125, 161-169.
- Jernvall, J., Kettunen, P., Karavanova, I., Martin, L. B., and Thesleff, I. (1994). Evidence for the role of the enamel knot as a control center in mammalian tooth cusp formation: non-dividing cells express growth stimulating Fgf-4 gene. *International Journal of Developmental Biology* 38, 463-469.
- Jernvall, J., and Thesleff, I. (2000). Reiterative signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis. *Mechanisms of Development* 92, 19-29.
- Kangas, A. T., Evans, A. R., Thesleff, I., and Jernvall, J. (2004). Nonindependence of mammalian dental characters. *Nature* 432, 211-214.

- Keranen, S. V. E., Aberg, T., Kettunen, P., Thesleff, I., and Jernvall, J. (1998). Association of developmental regulatory genes with the development of different molar tooth shapes in two species of rodents. *Development Genes and Evolution* 208, 477-486.
- Kere, J., Srivastava, A. K., Montonen, O., Zonana, J., Thomas, N., Ferguson, B., Munoz, F., Morgan, D., Clarke, A., Baybayan, P., *et al.* (1996). X-linked anhidrotic (hypohidrotic) ectodermal dysplasia is caused by mutation in a novel transmembrane protein. *Nature Genetics* 13, 409-416.
- Kratochwil, K., Galceran, J., Tontsch, S., Roth, W., and Grosschedl, R. (2002). FGF4, a direct target of LEF1 and Wnt signaling, can rescue the arrest of tooth organogenesis in *Lef1*(-/-) mice. *Genes & Development* 16, 3173-3185.
- Kristenova, P., Peterka, M., Lisi, S., Gendrault, J. L., Lesot, H., and Peterkova, R. (2002). Different morphotypes of functional dentition in the lower molar region of tabby (EDA) mice. *Orthodontics & craniofacial research* 5, 205-214.
- Kristenová-Cermáková, P., Peterka, M., Lisi, S., Lesot, H., and Peterková, R. (2002). Postnatal lower jaw dentition in different phenotypes of tabby mice. *Connect Tissue Res* 43, 283-288.
- Laurikkala, J., Mikkola, M., Mustonen, T., Aberg, T., Koppinen, P., Pispá, J., Nieminen, P., Galceran, J., Grosschedl, R., and Thesleff, I. (2001). TNF signaling via the ligand-receptor pair ectodysplasin and edar controls the function of epithelial signaling centers and is regulated by Wnt and activin during tooth organogenesis. *Developmental Biology* 229, 443-455.
- Lesot, H., Kristenova, P., Haze, A., Deutsch, D., Peterka, M., and Peterkova, R. (2004). Lower Incisors in the Tabby Mutant Mouse. Paper presented at: 18th ICCBMT (Alberta, Canada).
- Lesot, H., Vonesch, J. L., Peterka, M., Tureckova, J., Peterkova, R., and Ruch, J. V. (1996). Mouse molar morphogenesis revisited by three-dimensional reconstruction .2. Spatial distribution of mitoses and apoptosis in cap to bell staged first and second upper molar teeth. *International Journal of Developmental Biology* 40, 1017-1031.
- Liu, F., Chu, E. Y., Watt, B., Zhang, Y. H., Gallant, N. M., Andl, T., Yang, S. H., Lu, M. M., Piccolo, S., Schmidt-Ullrich, R., *et al.* (2008). Wnt/beta-catenin signaling directs multiple stages of tooth morphogenesis. *Developmental Biology* 313, 210-224.
- Lumsden, A. G. S. (1988). Spatial organization of the epithelium and the role of neural crest cells in the initiation of the mammalian tooth germ. *Development* 103, 155-169.
- Luukko, K., Loes, S., Furmanek, T., Fjeld, K., Kvinnsland, I. H., and Kettunen, P. (2003). Identification of a novel putative signaling center, the tertiary enamel knot in the postnatal mouse molar tooth. *Mechanisms of Development* 120, 270-276.
- Magloire, H., Couble, M. L., Thivichon-Prince, B., Maurin, J. C., and Bleicher, F. (2009). Odontoblast: A Mechano-Sensory Cell. *Journal of Experimental Zoology Part B-Molecular and Developmental Evolution* 312B, 416-424.

- Miard, S., Peterkova, R., Vonesch, J. L., Peterka, M., Ruch, J. V., and Lesot, H. (1999). Alterations in the incisor development in the Tabby mouse. *International Journal of Developmental Biology* 43, 517-529.
- Mina, M., and Kollar, E. J. (1987). The induction of odontogenesis in non-dental mesenchyme combined with early murine mandibular arch epithelium. *Archives of Oral Biology* 32, 123-127.
- Munne, P. M., Felszeghy, S., Jussila, M., Suomalainen, M., Thesleff, I., and Jernvall, J. (2010). Splitting placodes: effects of bone morphogenetic protein and Activin on the patterning and identity of mouse incisors. *Evolution & Development* 12, 383-392.
- Mustonen, T., Pispä, J., Mikkola, M. L., Pummila, M., Kangas, A. T., Pakkasjarvi, L., Jaatinen, R., and Thesleff, I. (2003). Stimulation of ectodermal organ development by ectodysplasin-A1. *Developmental Biology* 259, 123-136.
- Ohazama, A., Courtney, J. M., Tucker, A. S., Naito, A., Tanaka, S., Inoue, J. I., and Sharpe, P. T. (2004a). *Traf6* is essential for murine tooth cusp morphogenesis. *Developmental Dynamics* 229, 131-135.
- Ohazama, A., Hu, Y. L., Schmidt-Ullrich, R., Cao, Y. X., Scheidereit, C., Karin, M., and Sharpe, P. T. (2004b). A dual role for *lkk* alpha in tooth development. *Developmental Cell* 6, 219-227.
- Peterka, M., Lesot, H., and Peterkova, R. (2002). Body weight in mouse embryos specifies staging of tooth development. *Connective Tissue Research* 43, 186-190.
- Peterkova, R., Kristenova, P., Lesot, H., Lisi, S., Vonesch, J. L., Gendrault, J. L., and Peterka, M. (2002a). Different morphotypes of the tabby (EDA) dentition in the mouse mandible result from a defect in the mesio-distal segmentation of dental epithelium. *Orthodontics & craniofacial research* 5, 215-226.
- Peterkova, R., Lesot, H., Viriot, L., and Peterka, M. (2005). The supernumerary cheek tooth in tabby/EDA mice - a reminiscence of the premolar in mouse ancestors. *Archives of Oral Biology* 50, 219-225.
- Peterkova, R., Lesot, H., Vonesch, J. L., Peterka, M., and Ruch, J. V. (1996). Mouse molar morphogenesis revisited by three dimensional reconstruction .1. Analysis of initial stages of the first upper molar development revealed two transient buds. *International Journal of Developmental Biology* 40, 1009-1016.
- Peterkova, R., Peterka, M., Viriot, L., and Lesot, H. (2000). Dentition development and budding morphogenesis. *Journal of Craniofacial Genetics and Developmental Biology* 20, 158-172.
- Peterkova, R., Peterka, M., Viriot, L., and Lesot, H. (2002b). Development of the vestigial tooth primordia as part of mouse odontogenesis. Paper presented at: International Conference on Tooth Morphogenesis and Differentiation (Lyon, France).
- Peterkova, R., Peterka, M., Vonesch, J. L., and Ruch, J. V. (1993). Multiple developmental origin of the upper incisor in mouse - histological and computer-assisted 3-D-reconstruction studies. *International Journal of Developmental Biology* 37, 581-588.

Peterkova, R., Peterka, M., Vonesch, J. L., and Ruch, J. V. (1995). CONTRIBUTION OF 3-D COMPUTER-ASSISTED RECONSTRUCTIONS TO THE STUDY OF THE INITIAL STEPS OF MOUSE ODONTOGENESIS. *International Journal of Developmental Biology* 39, 239-247.

Pispa, J., Jung, H. S., Jernvall, J., Kettunen, P., Mustonen, T., Tabata, M. J., Kere, J., and Thesleff, I. (1999). Cusp patterning defect in Tabby mouse teeth and its partial rescue by FGF. *Developmental Biology* 216, 521-534.

Pispa, J., and Thesleff, I. (2003). Mechanisms of ectodermal organogenesis. *Developmental Biology* 262, 195-205.

Prochazka, J., Pantalacci, S., Churava, S., Rothova, M., Lambert, A., Lesot, H., Klein, O., Peterka, M., Laudet, V., and Peterkova, R. (2010). Patterning by heritage in mouse molar row development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 15497-15502.

Pummila, M., Fliniaux, I., Jaatinen, R., James, M. J., Laurikkala, J., Schneider, P., Thesleff, I., and Mikkola, M. L. (2007). Ectodysplasin has a dual role in ectodermal organogenesis: inhibition of Bmp activity and induction of Shh expression. *Development* 134, 117-125.

Ruch, J. V. (1984). Tooth morphogenesis and differentiation. In *Dentin and dentinogenesis*, A. Linde, ed. (CRC Press Boca Raton USA), pp. 47-79.

Sarkar, L., Cobourne, M., Naylor, S., Smalley, M., Dale, T., and Sharpe, P. T. (2000). Wnt/Shh interactions regulate ectodermal boundary formation during mammalian tooth development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 4520-4524.

Sofaer, J. A. (1969). Aspects of the tabby-crinkled-downless syndrome. I. The development of tabby teeth. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 22, 181-205.

Srivastava, A. K., Durmowicz, M. C., Hartung, A. J., Hudson, J., Ouzts, L. V., Donovan, D. M., Cui, C. Y., and Schlessinger, D. (2001). Ectodysplasin-A1 is sufficient to rescue both hair growth and sweat glands in Tabby mice. *Human Molecular Genetics* 10, 2973-2981.

Srivastava, A. K., Pispa, J., Hartung, A. J., Du, Y. Z., Ezer, S., Jenks, T., Shimada, T., Pekkanen, M., Mikkola, M. L., Ko, M. S. H., *et al.* (1997). The Tabby phenotype is caused by mutation in a mouse homologue of the EDA gene that reveals novel mouse and human exons and encodes a protein (ectodysplasin-A) with collagenous domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 13069-13074.

Thesleff, I., and Jernvall, J. (1997). The enamel knot: A putative signaling center regulating tooth development. Paper presented at: Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology - Pattern Formation During Development (Plainview, New York).

Tucker, A. S., Headon, D. J., Courtney, J. M., Overbeek, P., and Sharpe, P. T. (2004). The activation level of the TNF family receptor, Edar, determines cusp number and tooth number during tooth development. *Developmental Biology* 268, 185-194.

- Tucker, A. S., Headon, D. J., Schneider, P., Ferguson, B. M., Overbeek, P., Tschopp, J., and Sharpe, P. T. (2000). Edar/Eda interactions regulate enamel knot formation in tooth morphogenesis. *Development* 127, 4691-4700.
- Vaah Tokari, A., Aberg, T., Jernvall, J., Keranen, S., and Thesleff, I. (1996a). The enamel knot as a signaling center in the developing mouse tooth. *Mechanisms of Development* 54, 39-43.
- Vaah Tokari, A., Aberg, T., and Thesleff, I. (1996b). Apoptosis in the developing tooth: Association with an embryonic signaling center and suppression by EGF and FGF-4. *Development* 122, 121-129.
- Viriot, L., Lesot, H., Vonesch, J. L., Ruch, J. V., Peterka, M., and Peterkova, R. (2000). The presence of rudimentary odontogenic structures in the mouse embryonic mandible requires reinterpretation of developmental control of first lower molar histomorphogenesis. *International Journal of Developmental Biology* 44, 233-240.
- Viriot, L., Peterkova, R., Peterka, M., and Lesot, H. (2002). Evolutionary implications of the occurrence of two vestigial tooth germs during early odontogenesis in the mouse lower jaw. Paper presented at: International Conference on Tooth Morphogenesis and Differentiation (Lyon, France).
- Woodward, M. F. (1894). On the milk dentition of the rodentia, with a description of a vestigial milk incisor in the mouse (*Mus Musculus*). *Anatomischer Anzeiger* 9, 619 - 631.
- Yan, M. H., Wang, L. C., Hymowitz, S. G., Schilbach, S., Lee, J., Goddard, A., de Vos, A. M., Gao, W. Q., and Dixit, V. M. (2000). Two-amino acid molecular switch in an epithelial morphogen that regulates binding to two distinct receptors. *Science* 290, 523-527.
- Yen, A. H. H., and Sharpe, P. T. (2008). Stem cells and tooth tissue engineering. *Cell and Tissue Research* 331, 359-372.